

**UNIVERZITA KARLOVA  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE**



**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**FYZICKÉ MAPOVÁNÍ CENTROMERICKÝCH A KONCOVÝCH  
MARKERŮ U VAZEBNÝCH SKUPIN *XENOPUS TROPICALIS*.**

**PHYSICAL MAPPING OF CENTROMERIC AND TERMINAL  
MARKERS OF LINAGE GROUPS IN *XENOPUS TROPICALIS*.**

**LUCIE TŮMOVÁ**

**PRAHA 2009**

VEDOUCÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE:  
RNDr. Ing. Vladimír Krylov, PhD.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím uvedených literárních pramenů a pod vedením vedoucího diplomové práce, RNDr. Ing. Vladimíra Krylova, PhD.

**PRAHA, DUBEN 2009, LUCIE TŮMOVÁ .....**

Ráda bych poděkovala vedoucímu své diplomové práce RNDr. Ing. V. Krylovovi, PhD. a také RNDr. J. Máchovi i RNDr. T. Tlapákové, PhD. za cenné rady, připomínky, metodické vedení práce i za trpělivost.

Poděkování za spolupráci a skvělou pracovní atmosféru patří také ostatním členům naší laboratoře.

# OBSAH

<b>Seznam zkratek</b>	<b>7</b>
<b>1. Úvod</b>	<b>8</b>
1.1 Abstract	9
<b>2. Cíle diplomové práce</b>	<b>10</b>
<b>3. Literární přehled</b>	<b>11</b>
3.1 Modelové organismy ve vývojové biologii	11
3.1.1 Obojživelníci jako modelové organismy	11
3.1.2 Rod <i>Xenopus</i>	11
3.1.3 <i>Xenopus laevis</i>	11
3.1.4 <i>Xenopus tropicalis</i>	12
3.1.4.1 Genom <i>X. tropicalis</i>	13
3.2 Vazebné mapování geomu	14
3.2.1 Polymorfní genetické markery	14
3.2.1.1 RFPL – Restriction Fragment Length Polymorphism	15
3.2.1.2 RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA	15
3.2.1.3 AFLP – Amplification Fragment Length Polymorphism	16
3.2.1.4 SSLP – Simple Sequence Length Polymorphism	16
3.2.1.4.1 Mikrosatelity – SSR markery	16
3.2.1.4.2 Minisatelity – VNTR markery	17
3.2.1.5 SNP – Single Nucleotide Polymorphism	18
3.2.1.6 Intronové polymorfizmy	18
3.2.1.7 RH panel - panel radiačních hybridů	19
3.2.1.7.1 STS – Sequence-Tagged Site	19
3.2.1.7.2 EST – Expressed Sequence Tags	20
3.2.2 Konstrukce vazebné mapy	20
3.2.2.1 LOD score	20
3.2.2.2 Vazebné skupiny	21
3.2.2.3 Vazebná nerovnováha	21
3.2.3 Vazebné mapování <i>X. tropicalis</i>	22
3.2.3.1 Tvorba vazebné mapy <i>X. tropicalis</i> tvořené SSR markery	22
3.3 Gynogenetické křížení	23
3.3.1 Produkce gynogenetických kříženců	23

3.3.2 Hemitetrádová analýza	24
3.3.3 Meiotická interference	24
3.3.4 Specifický poměr rekombinací vzhledem k pohlaví	24
3.3.5 Pozice centromery a genová vazba	25
3.4 Fyzické mapování geonomu	25
3.4.1 Cytologické mapy	25
3.4.2 ISH – <i>In situ</i> Hybridization	26
3.4.3 FISH – Fluorescence <i>In situ</i> Hybridization	26
3.4.3.1 Typy FISH sond	27
3.4.3.2 Značení FISH sond	28
3.4.3.3 Amplifikace signálu FISH pomocí	29
3.4.3.3.1 CARD – Catalyzed Reporter Deposition	29
3.4.3.4 Amplifikace cílové sekvence FISH	29
3.4.3.4.1 PRINS – Primed <i>In situ</i> labelling	29
3.4.3.4.2 <i>In situ</i> PCR	30
3.4.4 Fyzické mapování u <i>X. tropicalis</i>	30
<b>4. Materiál</b>	<b>32</b>
4.1 Biologický materiál	32
4.2 Použité roztoky	32
4.3 Kity	33
4.4 Přístroje	33
<b>5. Metody</b>	<b>34</b>
5.1 Příprava značené sondy pro FISH	34
5.1.1 Navržení primerů pro PCR	34
5.1.2 Izolace RNA z tkání <i>X. tropicalis</i>	34
5.1.3 Reverzní transkripce	35
5.1.4 PCR amplifikace cDNA	35
5.1.5 Elektroforéza na agarovém gelu (ELFO)	36
5.1.6 Izolace PCR amplifikátu z agarového gelu	36
5.1.7 Klonování PCR amplifikátu přes plazmidový vektor	37
5.1.8 Restrikční štěpení plazmidové DNA (pDNA)	38
5.1.9 Měření koncentrace pDNA	38
5.1.10 Sekvenace	38
5.1.11 Amplifikace cDNA metodou rePCR	39

5.1.12 Značení cDNA	40
5.2 Zpracování buněčného materiálu z tkáňové kultury	40
5.2.1 Kultivace buněčné testikulární kultury in vitro	40
5.2.2 Synchronizace buněčného dělení a sběr buněk	40
5.2.3 Zpracování buněk pro nakapání	41
5.3 FISH	41
5.3.1 Příprava preparátů	41
5.3.2 Hybridizace	42
5.3.3 Posthybridizační promytí	42
5.3.4 Vizualizace a amplifikace signálu	42
5.3.5 Pozorování a zpracování signálů	43
5.3.6 Analýza získaných dat	43
<b>6. Výsledky</b>	<b>44</b>
6.1 Vyhledání a PCR amplifikace vhodných cDNA markerů	44
6.2 Syntéza cDNA značené sondy	49
6.3 FISH – TSA	49
6.4 Měření relativné vzdálenosti signálu od centromery (RCD)	53
6.5 Identifikace centromerických markerů	61
6.6 Určení rozsahu vazebných skupin	63
<b>7. Diskuze</b>	<b>66</b>
7.1 Orientace a rozsah všech vazebných skupin	66
7.2 Gen-centromerické mapování	68
<b>8. Závěr</b>	<b>70</b>
<b>Citovaná literatura</b>	<b>71</b>

## SEZNAM ZKRATEK

---

AFLP	Amplification Fragment Length Polymorphism
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
bp	base pair
CARD	Catalyzed Reporter Deposition
cDNA	complementary DNA
cM	centimorgan
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dsDNA	double strand Deoxyribonucleic Acid
ELFO	Electrophoresis
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
F1, F2 generace	první a druhá filiální generace
EST	Expressed Sequence Tag
FCS	Fetal Calf Serum
FISH	Fluorescence <i>In situ</i> Hybridization
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
GOLD	The Graphical Overview of Linkage Disequilibrium
HAT	Hypoxantin-Aminopterin-Thymidin
HGPRT	Hypoxantin-Guanin-Fosforibosyltransferase
HRT	Horseradish peroxidase
kbp	kilo base pair, 1 kbp = 1 000 bp
LD	Linkage Disequilibrium
LG	Linkage Group
LOD	Logarithm of the Odds Ratio
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MVR	Minisatellite Variant Repeat
p.a.	pro analysi
PAC	P1 Artificial Chromosome
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potential of Hydrogen
PRINS	Primed <i>In situ</i> labelling
QTL	Quantitative Trait Loci
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFPL	Restriction Fragment Length Polymorphism
RH	Radiation-reduced Hybrid
RNA	Ribonucleic Acid
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
ssDNA	single strand Deoxyribonucleic Acid
SSLP	Simple Sequence Length Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeat
STR	Short Tandem Repeat
STS	Sequence-Tagged Site
TMR	Tetramethylrhodamin
TSA	Tyramide Signal Amplification
VNTR	Variable Number Tandem Repeat

---

# 1. ÚVOD

*Xenopus tropicalis* patří spolu s příbuzným druhem *Xenopus laevis* mezi významné modelové organismy z pohledu studia vývojových procesů. Nedostatkem *Xenopus tropicalis* oproti dlouho zavedeným modelům (*Melanogaster*, *Mus* apod.) je absence úplné vazebné a fyzické mapy, které jsou předpokladem pro identifikaci vývojově významných genů, včetně jejich zařazení do syntenních skupin v rámci lidského genomu. V současné době existuje provizorní vazebná mapa, vytvořená skupinou patřící pod Oddělení biologie a biochemie University of Huston v Texasu, USA. Tvoří ji 10 vazebných skupin (LG1-LG10) a šest vazebných clusterů (A-F) složených z 1713 Simple Sequence Repeat (SSR) polymorfních markerů. Laboratoř vývojové biologie University Karlovy v Praze se na finalizaci vazebné mapy podílí fyzickým mapováním vybraných polymorfních markerů na chromozómech *Xenopus tropicalis*, díky kterému se již podařilo přiřadit všechny vazebné skupiny a clusterů k jednotlivým chromozómům a určit orientaci většiny z nich. Fyzické mapování terminálních markerů prokáže, nakolik vazebné skupiny pokrývají chromozómy po celé délce a které oblasti jsou zatím vazebně nezmapované.

Spolupracující laboratoř National Institute for Medical Research v Londýně, UK, pomocí metody gynogenetického křížení sestavila na základě vybraných markerů z provizorní vazebné mapy seznam hypotetických centromerických markerů. Pomocí cDNA sond a metody fluorescenční *in situ* hybridizace spojené s tyramidovou amplifikací signálu (FISH-TSA) lze polymorfní markery fyzicky mapovat na chromozómech *Xenopus tropicalis* a určit tak přesnou polohu centromer. Znalost centromerických poloh je nezbytná pro gynogenetické určení polohy vývojově významných genů a mutací.

## **Klíčová slova:**

*Xenopus tropicalis*, FISH-TSA, vazebná mapa, SSR polymorfní markery, centromery, terminální markery, gynogenetické křížení



# 1.1 Abstract

*Xenopus tropicalis* belongs together with its related genus *Xenopus laevis* to important model organisms on the field of study of developmental processes. In comparison to well introduced models (i.e. *Melanogaster*, *Mus* etc.) for *Xenopus tropicalis* there is an absence of linkage and physical maps that have invaluable importance for the identification of developmentally relevant genes, including their syntenicity with human. Currently, there exists provisional linkage map constructed by scientific group of Department of Biology and Biochemistry, University of Houston, Texas, USA. It is constituted of ten linkage groups (LG1-LG10) and six linkage clusters (A-F) composed by total of 1713 Simple Sequence Repeat (SSR) polymorphic markers. The laboratory of developmental biology, Charles University in Prague, participates in completing the linkage map by physical mapping of chosen polymorphic markers on chromosomes *Xenopus tropicalis*, which led to allocation of each linkage group and cluster to the right chromosome and to assessment of the orientation in most of them. The physical mapping of terminal markers will show us, how far chromosomes are covered with linkage groups and which areas still remain unmapped.

The cooperative laboratory from National Institute for Medical Research, London, UK, originated a list of hypothetical centromeric markers on the basis of data from gynogenetic breeding and from the provisional linkage map. Using cDNA probes and fluorescence *in situ* hybridization coupled with tyramide signal amplification step (FISH-TSA) we are able to map polymorphic markers on chromosomes *Xenopus tropicalis* physically and determine the true centromeric position. The knowledge in centromeric positions is necessary for next gynogenetic determination of developmentally relevant genes and mutations position.

## **Keywords:**

*Xenopus tropicalis*, FISH-TSA, linkage map, SSR polymorphic markers, centromeres, terminal markers, gynogenetic breeding

## 2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo fyzické mapování SSR polymorfních markerů u *Xenopus tropicalis* pomocí metody fluorescenční *in situ* hybridizace spojené s tyramidovou amplifikací signálu (FISH-TSA) na základě údajů z gynogenetického křížení, určení centromerických a terminálních markerů u každé vazebné skupiny a statistické vyhodnocení jejich polohy.

- Získání údajů z gynogenetického křížení a jejich vyhodnocení.
- Získání cDNA sond pro fyzické mapování (FISH-TSA).
- Ověření údajů získaných z gynogenetického křížení pomocí fyzického mapování, statistické vyhodnocení poloh markerů.
- Korekce markerů a údajů ve vazebné mapě.
- Identifikace centromerických markerů.
- Mapování markerů konců vazebných skupin a ověření pokrytí vazebných skupin v rámci jednotlivých chromozómů.
- Osvojení metod – polymerase chain reaction (PCR), gelová elektroforéza (ELFO), klonování do DNA plazmidového vektoru, manipulace s tkáňovými kulturami, fluorescenční *in situ* hybridizace spojená s tyramidovou amplifikací (FISH-TSA), ovládání softwaru DipsW 5.0 a ACC32 5.0

### 3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

#### 3.1 Modelové organismy ve vývojové biologii

Vývojová biologie má pro potřeby studia diferenciace a proliferace buněk, morfogeneze aj. několik rozšířených modelových organismů. Jsou jimi například *Dictyostelium discoideum* (Hlenky), *Caenorhabditis elegans* (Nematoda), *Drosophila melanogaster* (Diptera), ježovka (Echinodermata), *Danio rerio* (Cyprinidae), *Mus musculus* (Rodentia) a v neposlední řadě někteří obojživelníci (Bolker, 2005). První experimenty probíhaly na embryích skokana (*Rana sp.*), čolka (*Triturus sp.*) a mloka (*Ambystoma*). Od 50. let 20. století se nejvíce používaným druhem stal *Xenopus laevis*. Přes úspěchy spojené se studiem vývojových procesů tento pseudotetraploidní organismus neumožňuje jednoznačné genetické analýzy. To se změnilo se zaměřením studií na příbuzný druh *Xenopus tropicalis* (Amaya et al, 1998).

##### 3.1.1 Obojživelníci jako modelové organismy

Obojživelníci patří mezi nejrozšířenější modelové organismy vývojové biologie. Hlavní výhodou oproti savcům je vnější oplození, rychlý a dobře pozorovatelný vývoj embryí, značný počet oocytů produkovaných samicí a relativně krátká generační doba. Rybí modely (např. *Danio rerio*) poskytující podobné výhody jako obojživelníci mají na druhou stranu relativně fragilní a citlivá embrya (Hirsch et al, 2002).

##### 3.1.2 Rod *Xenopus*

Rod *Xenopus* (drápatka) je řazen do podčeledě *Xenopidinae*, čeldi *Pipidae*, řádu *Anura* (de Sá and Hillis, 1990). Je tvořen cca dvaceti druhy, které jsou až na jeden polyploidní, počínaje tetraploidními druhy (4n) až po druhy dodekaploidní (12n). *Xenopus laevis* byl prvním intenzivně studovaným druhem z této skupiny, který se začal používat pro laboratorní experimenty a srovnání s ostatními druhy (Amaya et al, 1998).

##### 3.1.3 *Xenopus laevis*

Na základě chromozomální morfologie ( $2n = 36$ ) a způsobu formování bivalentů během meiózy byl *Xenopus laevis* (Drápatka vodní) nejprve klasifikován jako diploidní druh (Tymowska, 1973). Pozdější práce prokázaly, že v rámci jeho evoluce došlo

k duplikaci genomu. *X. laevis* tedy náleží spíše mezi tetraploidní, respektive alotetraploidní druhy (Amaya et al, 1998). Alotetraploidní genom vznikl zachováním obou rodičovských genomů při křížení, proto je při izolaci nových genů často popisován výskyt dvou paralogů. Genom však byl během vývoje opět zredukován a stal se částečně diploidním, duplikované geny mají na sobě nezávislou dědičnost (Graff, 1989).

*X. laevis* je vodním živočichem a může být chován v akváriu, živí se mrtvým organickým materiálem a je velmi tolerantní k různým životním podmínkám. Tyto vlastnosti jsou výhodné pro laboratorní chov. Ovulace je u samice snadno navoditelná injekcí gonadotropinu (Thiébaud, 1984). Ve 30. letech se tato vlastnost používala pro jednoduchý těhotenský test a vedla k celosvětovému rozšíření a používání tohoto druhu (Bellerby, 1934). Velikost oocytů (1,0 - 1,3 mm) a embryí je dostatečná pro mikromanipulace a po zákroku vykazují značnou živatoschopnost. (Hirsch et al, 2002).

Buněčně biologické studie provedené na tomto modelu objasnily mechanizmy kontroly buněčného cyklu, cytoskeletárního systému, replikace chromozómů, signalizace aj. Na druhou stranu jsou genetické analýzy, založené na silencingu, missexpresi, overexpresi či knock-outu genů díky polyploidnímu charakteru nejednoznačné. (Amaya et al, 1998).

### 3.1.4 *Xenopus tropicalis*

*Xenopus tropicalis* je jediným diploidním druhem rodu *Xenopus*. Některé morfologické studie čeledě *Pipidae* uvádějí, že *X. tropicalis* je blíže příbuzný rodu *Silaruna* (de Sá and Hillis, 1990). Výsledky karyotypických, morfogenetických a molekulárních studií však ukazují na monofyletický vývoj se zbytkem rodu *Xenopus* (Amaya et al, 1998).

*X. tropicalis* poskytuje obdobné výhody pro chov v laboratoři jako příbuzný *X. laevis*. Vyniká však také dalšími vlastnostmi, které z tohoto živočicha činí výhodný modelový systém. Generační doba 4 - 6 měsíců je pravděpodobně nejkratší mezi obojživelníky (generační doba *X. laevis* je 1 - 2 roky) (Amaya et al, 1998). *X. tropicalis* je také menší. Dospělý jedinec měří 4 – 5 cm (*X. laevis* okolo 10 cm), což zjednodušuje jeho chov. Dospělá samice je schopná vyprodukovat mezi 1 až 3 tisíci oocyty s průměrem 0,7 – 0,8 mm. Tato velikost je stále dostatečná pro provádění mikroinjekčních experimentů (<http://www.nimr.mrc.ac.uk/devbiol/zimmerman/xenopus/>). Vykazují také menší variabilitu ve vývoji. Evoluční příbuznost s *X. laevis* navíc umožňuje využít pro tento model zavedené molekulární přístupy, RNA sondy a protilátky (Amaya et al, 1998).

#### 3.1.4.1 Genom *X. tropicalis*

Velikost genomu *X. tropicalis* je přibližně  $1,7 \times 10^9$  bp, což je přibližně polovina velikosti genomu *X. laevis* ( $3.1 \times 10^9$  bp). Genom je rozdělen do 10 chromozomálních párů. Karyotyp, seřazený podle relativní délky p a q ramene chromozómů, je tvořen 6 skupinami a 2 chromozómové páry nesou výrazné sekundární konstriktce (Tymowska, 1973).

Vzhledem k rozšíření *X. tropicalis* jako výhodného modelového systému se v prosinci roku 2001 The Joint Genome Institute of the Department of Energy (JGI) rozhodl zahájit projekt sekvenace jeho genomu brokovnicovou metodou pomocí BAC (Bacterial artificial chromosome) knihoven. Projekt byl zahájen v průběhu roku 2002 a zapojil se do něho také The National Institutes of Health (<http://faculty.virginia.edu/xtropicalis/GenomeBACintro.htm>).

Výsledek sekvenace v současné době představuje 19 501 scaffoldů (osekvenované úseky DNA, řazené sestupně podle velikosti), přičemž zhruba polovina genomu je soustředěna do prvních 272 scaffoldů (Amaya, 2005; [http://www.ensembl.org/Xenopus\\_tropicalis/Info/Index](http://www.ensembl.org/Xenopus_tropicalis/Info/Index)). Kompletní sekvenace a zmapování genomu umožní komplexní objasnění genetických mechanismů kontrolujících vývojové procesy, identifikaci mutací pozičním klonováním, ale také poskytne nezbytné informace pro evoluční studie.

Vedle projektů sekvenace genomu jsou dále generovány EST (Expressed Sequence Tag) sekvence, BAC (Bacterial Artificial Chromosome), PAC (P1 Artificial Chromosome) a cDNA knihovny (Klein et al, 2002). Pomocí bioinformatických metod, morfolino oligonukleotidů, gynogenetického křížení aj. bylo izolováno více než 60 mutací ovlivňujících časný zárodečný vývoj (Amaya, 2005; <http://www.nimr.mrc.ac.uk/devbiol/zimmerman/xenopus/>).

K dispozici jsou inbrední linie IC (Ivory Coast) a N (Nigerian) kmenů, jejichž vzájemným křížením a analýzou potomstva vzniká vazebná mapa SSR polymorfních markerů v rámci projektu The Biology and Biochemistry department, University of Houston, spolu s The Human Genome Center at Baylor College of Medicine. Postup a aktuální vývoj vazebné mapy *X. tropicalis* lze sledovat na webových stránkách <http://tropmap.biology.uh.edu>.

## 3.2 Vazebné mapování genomu

Vazebná mapa a molekulární markery jsou nepostradatelné prerekvizity pro charakterizaci genomu jakéhokoliv modelového organismu (Varshney et al, 2009). Vazebné mapování je založeno na frekvenci rekombinace na chromozómech. Podstatou rekombinace je meiotický „crossing-over“, probíhající mezi homologními oblastmi chromozómů. Obecně platí, že pravděpodobnost rekombinace je mírou vzdálenosti mezi dvěma lokusy (lat. *locus* = místo) na chromozómech. Měřítkem genetické vazebné mapy je 1 centimorgan (cM), který odpovídá 1 % rekombinací. Čím jsou tedy od sebe lokusy vzdálenější, tím vyšší je pravděpodobnost této události. Mezi vzdálenými lokusy však může dojít ke 2 či více rekombinacím. Pokud druhá rekombinace vrací lokusy do výchozích pozic, obě se stávají nedetekovatelnými a jejich vzájemná vzdálenost se na vazebné mapě zmenšuje vzhledem k reálné vzdálenosti.

Některá místa na chromozómech mají vyšší frekvenci rekombinací než jiná, což zkracuje jejich vzdálenost na vazebné mapě. Měřítka vazebné mapy je tudíž relativní (Henderson, 1970; Hykelová, 2003). Lze určit několik obecných míst, kde k rekombinacím dochází velmi málo jako např. centromery. Obecně lze pozorovat, že od centromer směrem k telomerám frekvence rekombinace stoupá.

Jako genetický marker slouží polymorfní lokusy, tedy takové, které se v populaci druhu vyskytují nejméně ve dvou alelách. Jsou to tedy variace na úrovni DNA. Minimální polymorfismus je polymorfismus v jednom nukleotidu, SNP. V minulosti byly pro tvorbu vazebné mapy využívány fenotypově detekovatelné markery (barva oka, produkce enzymu aj.), získané z kódující sekvence DNA (Tanksley a Rick, 1980). DNA eukaryotického genomu je však z velké části nekódující. Vazebné mapy složené pouze z polymorfismů kódujících sekvencí by proto byly velmi řídké. Mapy s vyšším rozlišením je možno konstruovat pomocí markerů polymorfních nekódujících sekvencí DNA, které se nepojí s rozpoznatelným fenotypem.

### 3.2.1 Polymorfní genetické markery

DNA markery lze charakterizovat jako dominantní nebo kodominantní. Polymorfismus dominantních markerů je detekován jako fragment konstantní délky, který u jedince buď je, nebo není amplifikován. Standardním PCR nelze rozlišit, zda byl marker amplifikován z jedince homozygótního nebo heterozygótního. Kodominantní markery jsou

definovány jako segmenty různé délky, amplifikované z téhož lokusu. Tento druh markerů umožňuje odlišit heterozygáty od homozygátů

Genetické markery můžeme rozdělit podle charakteru jejich polymorfizmu či podle metody, jakou se připravují – markery založené na PCR a markery založené na hybridizaci DNA (Knoll et al, 2003).

#### 3.2.1.1 RFPL – Restriction Fragment Length Polymorphism

Metoda RFPL (polymorfizmus délky restrikčních fragmentů) je metoda založená na štěpení DNA panelem restrikčních endonukleáz, elektroforetické separaci štěpů a hybridizaci se specifickou DNA sondou použitím Southernovy techniky (Southern, 1975). Mutace v restrikčním místě změní velikost restrikčních fragmentů a tedy i velikost proužků po hybridizaci.

RFLP analýza je závislá na dostupnosti DNA sond pro detekci homologních sekvencí. RFLP markery pro jadernou DNA jsou pro genetickou analýzu a sestavování RFLP map používány jako kodominantní (Botstein et al, 1980; Saiki et al, 1985). Ve srovnání s metodami postavenými na amplifikační strategii však vyžaduje velké množství čisté DNA. Výhodou je její nenáročnost a možnost určení místa mutace. Mezi nevýhody patří to, že pravděpodobnost detekce mutace polymorfizmu (mutace) je relativně nízká a závisí na počtu použitých enzymů. Metoda je vhodná pro geny s větším polymorfizmem nebo nekódující sekvence (Lee et al, 2009).

#### 3.2.1.2 RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA

Metoda RAPD (náhodně amplifikovaná polymorfnní DNA) patří mezi PCR techniky. Poprvé byla publikována v roce 1990. RAPD obchází hlavní nevýhodu PCR, nutnost znalosti cílových sekvencí DNA fragmentů, použitím pouze jednoho libovolného krátkého (6 - 8 nukleotidů) oligonukleotidového primeru (Reiter et al, 1992). Při této délce je značná pravděpodobnost, že v genomu bude mnoho míst homologních k použitému oligonukleotidu a některá z nich budou dostatečně blízko u sebe (zpravidla ne dále než 2 kbp), aby v úseku mezi nimi při využití PCR docházelo k amplifikaci DNA (Williams et al, 1990). Výsledkem je spektrum amplifikačních produktů, které se liší svojí délkou.

RAPD vykazují vysoký stupeň polymorfizmu, a proto mohou být genetickými markery jak pro tvorbu genetických map, tak i pro mapování QTL (Quantitative Trait Loci, kvantitativně dědičné znaky), fingerprinting DNA, měření genetických vzdáleností mezi

populacemi aj. RAPD mají dominantní charakter, nelze odlišit hetero- a homozygótní genotyp.

### 3.2.1.3 AFLP – Amplification Fragment Length Polymorphism

Metoda AFLP (polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů) kombinuje postupy RFLP a PCR. Metoda je založena na detekci fragmentů DNA, získaných štěpením restrikčními endonukleázami, prostřednictvím PCR amplifikace. V prvním kroku se provede štěpení DNA restrikčními endonukleázami. Následuje ligace adaptérů – krátkých oligonukleotidů, které jsou komplementární k vytvořeným restrikčním místům. Vzniklé ligační produkty se amplifikují s primery, komplementárními se sekvencí adaptérů (Vos et al, 1995) V posledním kroku se provede elektroforéza na polyakrylamidovém gelu.

Výhodou AFLP je, že spektrum fragmentů je možné získat bez předcházející znalosti sekvence DNA a počet fragmentů detekovaných v jedné reakci je dán sadami specifických primerů (Mueller a Wolfenbarger, 1999). Metoda je poměrně časově i finančně nenáročná a umožňuje vysoce specifickou amplifikaci 50 – 100 restrikčních fragmentů najednou (Kochan et al, 2003). AFLP lze odečítat kodominantně a vykazuje vysokou hustotu markerů. Z tohoto důvodu je tato metoda vhodná jak pro genetické mapování, tak i pro poziční klonování, studium biodiverzity a genetických vzdáleností, srovnávací studie genomu (Meudt a Clarke, 2007).

### 3.2.1.4 SSLP – Simple Sequence Length Polymorphism

SSLP (polymorfismus v délce sekvence) zahrnuje nekódující vysoce repetitivní úseky DNA. Tyto úseky jsou využívány jako genetické markery v podobě mikrosatelitů (STR – Short Tandem Repeat nebo také SSR markery – Simple Sequence Repeat) a minisatelitů (též označované VNTR – Variable Number Tandem Repeat).

#### 3.2.1.4.1 Mikrosatelity – SSR markery

SSR markery (markery s opakující se jednoduchou sekvencí) jsou sekvence DNA složené z tandemových motivů o délce 1 – 6 nukleotidů, opakující se 10 – 100 krát. Jsou součástí kódujících i nekódujících oblastí genomu, obvykle se však tato polymorfní místa vyskytují v nekódujících oblastech (Tautz a Renz, 1984).

Je prokázáno, že v průběhu evoluce dochází k prodlužování repetitivních sekvencí, což lze pozorovat již v průběhu několika stovek generací. Další mikrosatelity se



ovšem mohou snadno vyštěpit rekombinací. Mnoho mikrosatelitů je tak mutačně nestabilních, v některých případech dokonce extrémně. Obecně jsou repetitivní sekvece bohaté na CGC tri a CA dinukleotidy více nestabilní než jiné (Kuhl et al., 1993). Zdá se ale, že některé mikrosatelitové sekvece získaly časem určitou funkci, která přispívá k jejich udržení v genomu (Queller et al, 1993).

Podle složení lze mikrosatelitní sekvece rozdělit na dokonalé, nedokonalé a složené. Dokonalý mikrosatelit je tvořen souvislým motivem, např. (AG)<sub>24</sub>. U nedokonalých lze pozorovat několik různých motivů, např. (AG)<sub>14</sub>(AT)<sub>35</sub>. Oblasti přilehlé k mikrosatelitům jsou obvykle unikátní a tudíž lze navrhnout specifické primery pro PCR reakci. Díky malé velikosti a délkovému polymorfizmu jednotlivých lokusů se screening provádí jednoduše amplifikací lokusů pomocí PCR z okrajových primerů a následnou elektroforézou. Tato metoda je časově nenáročná a dají se tak hodnotit různé lokusy ve velkém počtu vzorků najednou.

Mikrosatelity jsou markery kodominantní, tj. od každého jedince získáme dva typy amplifikátů. Markery jsou vysoce polymorfní a vyskytují se prakticky ve všech eukaryotních genomech i v některých genomech prokaryot (Goldstein et al, 1995). Mikrosatelity se proto staly dobrým nástrojem pro konstrukci vazebných map a mají také velké využití v oblasti populační genetiky a molekulární evoluce. Získávají se buďto prohledáváním známých sekvencí obsažených v databázích nebo izolací z různých typů DNA knihoven (Jia et al, 2009).

#### 3.2.1.4.2 Minisatelity – VNTR markery

Minisatelity jsou 10 – 16 nukleotidů dlouhé sekvece, vyskytující se v tandemu až 1000 repetice (obvyklý počet bývá 4 – 40) (Jeffreys et al, 1985). Počet opakování minisatelitu může u jednotlivých jedinců studované populace kolísat a tato variabilita je detekována jako variabilita délky restrikčních fragmentů po štěpení DNA restrikčními enzymy, které neštěpí v rámci sekvencí dané repetice. Stejně jako u mikrosatelitů, oblasti přiléhající k minisatelitům jsou unikátní a lze proto použít specifické primery pro PCR reakci (Keim et al, 2000). Analýza různorodosti PCR amplifikátů je zde ale poněkud nevýhodná vzhledem k větší délce minisatelitů. Tento problém řeší metoda MVR – Minisatellite Variant Repeat. Ta umožnila analýzu vnitřních variací repetice, které jsou přítomny u velkého množství minisatelitů. Metoda vyžaduje použití primerů, které jsou navrženy specificky pro varianty repetice a umožňují postupnou PCR analýzu dlouhých opakujících se oblastí s občasnými variacemi (Tamaki et al, 1992).

Minisatelity jsou také vysoce polymorfní, většina z lokusů vykazuje velké množství polymorfizmů v důsledku různého počtu repetic. Příčinou této genetické variability je hojnost mutací, která může dosáhnout i 10 % na gametu. Tato nestabilita je pravděpodobně daná samotnou sekvencí repetic (Jeffreys et al, 1985). Také tyto markery jsou kodominantní a tudíž vysoce informativní. Jsou vhodné především pro DNA fingerprinting, ale i pro tvorbu vazebných map, studium genetické diverzity a molekulární evoluce (Nakamura et al, 1987).

#### 3.2.1.5 SNP – Single Nucleotide Polymorphism

SNP (polymorfismus jednotlivých nukleotidů) zahrnuje většinou bialelické markery (populace obsahuje jen 2 alely) – bodové mutace, které se mohou nacházet v sekvencích genu, v intronových oblastech či ve zcela nekódujících sekvencích. Vznikají nejčastěji záměnou jedné báze při replikaci či reparaci DNA s frekvencí 1 % populace. Tyto varianty až z 80 % určují diverzitu v populaci, vnímavost k nemocem a individuální odpověď k léčivům a jsou tedy vhodné pro genetické studium (Carlson, 2008). Pokud záměna nukleotidu nemění sekvenci výsledného polypeptidu, je nazývána synonymní, v opačném případě nesynonymní (Cargill et al, 1999).

Pro mapování SNP mohou být použity různé metody, například mohou být detekovány jako RFLP (Orita et al, 1989). V případě, že neexistuje rozpoznávací místo pro restriktázu, lze k detekci použít jiné metody na bázi PCR, DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) nebo SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), případně pouze sekvenace (Rapley a Harbron, 2004).

Mapování vyžaduje velké množství prostředků a času. Vzhledem k velkému medicínskému významu jsou SNP hledány především v lidském genomu (Carlson, 2008).

#### 3.2.1.6 Intronové polymorfizmy

Introny často nesou repetitivní oblasti, zbytky mobilních elementů a často obsahují mutace, které poskytují dostatečné množství alel v populaci. Jejich amplifikace PCR reakcí je možná díky unikátním sekvencím přiléhajících exonů. Délkové polymorfizmy intronů je pak možné analyzovat na agarózovém gelu. Pro větší citlivost techniky je vhodné zařadit štěpení restriktční endonukleázou a porovnávat délky restriktčních fragmentů (Mácha et al., 2003).

### 3.2.1.7 RH panel - panel radiačních hybridů

Radiační hybridy jsou buňky, které kromě svého genetického materiálu obsahují i genetický materiál odlišného živočišného druhu. Jsou produkovány fúzí ozářených donorových buněk s buňkami příjemce (nejčastěji hlodavci). Fúzi lze indukovat buď chemicky aplikací polyetylglykolu nebo biologicky vystavením buněk působení Sendai viru (McCarthy, 1996).

Chromozómy použitých buněk jsou po ozáření radioaktivními paprsky rozlámány na velký počet fragmentů. Je možné konstruovat panely s několika, ale i s velkým počtem různých markerů. Fragmenty jsou při fúzi náhodně zainkorporovány do akceptorových buněk a každá z výsledných buněčných linií si udrží část z genomu dárce. Markery, které fyzicky leží blízko u sebe jsou velmi často udrženy tou samou buněčnou linií. U výsledných hybridů je analyzována přítomnost, případně nepřítomnost testovaných DNA markerů, a dále frekvence, s jakou se jednotlivé markery objevují v jedné buněčné linii. Čím blíže se markery nacházejí v donorovém genomu, tím je vyšší pravděpodobnost jejich současného výskytu v jedné hybridní linii (Hudson et al, 2001).

Selekce hybridních buněk obvykle probíhá kultivací v HAT (Hypoxantin-Aminopterin-Tymidin) médiu. Jedna linie buněk je deficientní pro HGPRT (hypoxantin-guanin-fosforibosyltransferáza) a druhá pro TK (tymidin-kináza). Aminopterin v médiu blokuje *de novo* syntézu purinů a pyrimidinů. Pokud jsou ale v buňce funkční oba zmíněné enzymy, puriny a pyrimidiny mohou být syntetizovány alternativní dráhou za využití hypoxantinu a tymidinu. Takto jsou pozitivně selektovány pouze úspěšně fúzované buňky, které ve svých chromozómech nesou vloženou sadu náhodných DNA fragmentů mapovaného druhu. Sada těchto buněk pokrývajících celý genom se nazývá panel radiačních hybridů (McCarthy, 1996).

Rekombinační mapy jsou limitovány polymorfními markery a omezeny frekvencí rekombinací. Oproti tomu RH panel využívá rozdílů mezi dvěma živočišnými druhy a může tak mapovat jak polymorfní, tak i nepolymorfní markery, jako např. STS sekvence (Sequence- Tagged Site). RH panel tak dovoluje robustní mapování a umožňuje spolehlivé statistické stanovení spolehlivosti (Gapay et al, 1995).

#### 3.2.1.7.1 STS – Sequence-Tagged Site

STS (Sequence-tagged site) jsou 200 – 500 bp dlouhé unikátní úseky DNA, jejichž poloha v genomu je známá. Slouží jako orientační body při fyzickém mapování genomu

(Erpelding et al, 1996). Při jejich získávání je nejprve genomová DNA rozštěpena restrikcí na menší úseky, každý fragment je izolován a purifikován. Poté jsou v těchto fragmentech vybrány unikátní oblasti STS. S jejich pomocí lze sestavit fyzickou mapu založenou na vzájemné pozici STS oblastí. Použití YAC (Yeast Artificial Chromosomes) jako klonovacího systému s využitím PCR pro detekci STS výrazně zlepšilo účinek této metody pro tvorbu fyzických map (Green a Green, 1991).

Nejběžněji mapované STS jsou výše popsané SSLP nebo RAPD markery, případně tzv. EST sekvence (Expressed Sequence Tags).

#### 3.2.1.7.2 EST – Expressed Sequence Tags

EST jsou krátké subsekvence transkribované DNA, které jsou získávány analýzou cDNA klonů. Bývají dlouhé 100 až 600 bp a bývají používány pro identifikaci genových produktů na úrovni DNA (Marra et al, 1998).

Kompletní nebo částečné nukleotidové sekvence těchto cDNA klonů jsou běžně přístupné v internetových databázích

### 3.2.2 Konstrukce vazebné mapy

Poměr počtu rekombinantů vzhledem k počtu potomků udává vazebnou vzdálenost na genetické mapě. Čím menší je poměr, tím silnější mají k sobě analyzované lokusy vazbu. Naopak při vysokém počtu rekombinantů leží lokusy velmi daleko od sebe, často na jiném chromozómu.

#### 3.2.2.1 LOD score

Pro stanovení vazby mezi lokusy je důležité rozlišit mezi náhodnými fluktuacemi počtu potomků v každé skupině a skutečnou vazbou. Nejčastěji používaným statistickým testem je LOD score, navržené Newtonem E. Mortonem. LOD (logarithm of the odds ratio) je dekadický logaritmus poměru pravděpodobnosti nulové hypotézy, která praví, že vazba neexistuje (rekombinační zlomek  $1/2$ ), s alternativní hypotézou, která tvrdí, že existuje vazba s určitým rekombinačním zlomkem  $\theta < 1/2$  (Morton, 1955).

Ve vazebné analýze se LOD skóre větší než 3 považuje za signifikantní, tj. pravděpodobnost vazby je 1 000x větší než pravděpodobnost nulové hypotézy. Často je také třeba vyloučit vazbu, například aby bylo možno snížit množství kandidátních genů pro další studie. Pro vyloučení vazby je požadováno LOD skóre menší než -2, tj. absence vazby je 100x pravděpodobnější než existence vazby (Luo et al, 2001).

Tato statistická metoda je základem mnoha počítačových programů na analýzu velkého množství dat získaných při křížení.

### 3.2.2.2 Vazebné skupiny

Je-li analyzován velký počet markerů a tyto markery mají být sestaveny do vazebné mapy, je prvním krokem jejich roztřídění do vazebných skupin (LG – linkage group). Pokud jsou 2 markery pomocí LOD score prokazatelně ve vazbě, patří do jedné vazebné skupiny. Počítačové porovnání všech markerů vzhledem k určitému prahu LOD score vede k ustanovení vazebných skupin. V ideálním případě je počet vazebných skupin roven počtu haploidní sady chromozómů studovaného organismu. Většinou se ale podaří jich sestavit více. Důvodem je použití vysoké hranice LOD score, aby bylo vyloučeno chybné spojení markerů do vazby (Buetow, 2001).

Ideálním řešením tohoto problému je následné fyzické mapování markerů, které umožní přiřadit jednotlivé vazebné skupiny a clustery ke konkrétním chromozómům. Tímto způsobem lze také získat představu, zda vazebná skupina pokrývá celý chromozóm, nebo zda jsou na něm další slepá místa, které je nutné mapovat jiným přístupem.

### 3.2.2.3 Vazebná nerovnováha

Vazebná nerovnováha (LD – linkage disequilibrium) je nenáhodná vazba mezi 2 nebo více lokusy, jež mohou být i na různých chromozómech. Nejedná se o stejný vztah jako genetická vazba, která je založena na frekvenci rekombinace mezi 2 lokusy na stejném chromozómu. Vazebná nerovnováha popisuje situaci, kdy se nějaká kombinace alel či genetických markerů vyskytuje v populaci s vyšší nebo naopak nižší frekvencí, než by se dalo očekávat při náhodném formování haplotypů (Abecasis a Cookson, 2000; Pffafelhuber et al, 2008). Míra vazebné nerovnováhy je závislá na mnoha faktorech, jako je genetická vazba, poměr rekombinací, mutace a populační struktura. Některé organismy mají například vyšší LD díky tomu, že se rozmnožují pouze asexuálně a rekombinace tak nemůže vazebnou rovnováhu narušovat (Devlin a Risch, 1995). Tento nenáhodný vztah mezi polymorfizmy na různých lokusech je měřen na stupně LD.

Běžně je vazebná nerovnováha analyzována statisticky různými systémy, jako je například Lewentinův standardizovaný nerovnovážný koeficient  $D'$ , které umožňují vznik mapy na základě LD (Lewontin a Kojima, 1960). Při vysokých počtech analyzovaných markerů, kdy tvorba mapy je již poměrně nepohodlná, je další možností grafický přehled (GOLD – The Graphical Overview of Linkage Disequilibrium), který umožňuje snadnou

interpretaci grafické reprezentace vzorků nerovnováhy v určité oblasti a jejich vztah ke genetické či fyzické mapě (Abecasis a Cookson, 2000).

### 3.2.3 Vazebné mapování *X. tropicalis*

Projekt sekvenace genomu *X. tropicalis* JGI poskytuje kompletní sekvenci genomu, rozdělenou do překrývajících se scaffoldů (viz. 3.1.4.1). Jedním z úkolů vazebného mapování je seřazení scaffoldů do správného pořadí a jejich identifikaci vzhledem k jednotlivým vazebným skupinám. Existence scaffoldů také umožňuje fyzické ověření správnosti vazebného mapování.

První genetická mapa *X. tropicalis* byla sestavena s použitím metody AFLP. Pro sestavení mapy bylo použito 51 maternálních AFLP markerů a 2 isoenzymních markerů, celkem rozdělených do 13 vazebných skupin. Druhá část mapy obsahovala 9 paternálních AFLP markerů ve 3 vazebných skupinách (Kochan et al, 2003).

V rámci projektu The Biology and Biochemistry department, University of Houston, společně s The Human Genome Center at Baylor College of Medicine v současné době finalizují práce na konstrukci vazebné mapy SSR polymorfních markerů. Její provizorní podobu a vývoj lze sledovat na webových stránkách <http://tropmap.biology.uh.edu>.

#### 3.2.3.1 Tvorba vazebné mapy *X. tropicalis* tvořené SSR markery

Tato vazebná mapa je generována pomocí programu JoinMap 3.0. Prozatím byly uveřejněny výsledky analýzy 1 713 polymorfních markerů a 1 558 z nich bylo umístěno do 10 vazebných skupin, odpovídajících 10 párům chromozómů *X. tropicalis*. Zbylé markery byly roztříděny do 6 malých clusterů s označením A - F (v každém clusteru je průměrně 12 markerů). V počáteční fázi projektu nebyly clusteru na základě LOD score spojeny s žádnou vazebnou mapou (<http://tropmap.biology.uh.edu>). Analýza dalších polymorfních SSR markerů probíhá. Laboratoř vývojové biologie Univerzity Karlovy v Praze ověřuje data provizorní vazebné mapy pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH).

Při vytváření mapy byly v prvním kroku identifikovány unikátní SSR markery (<http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/runAlignment?db=Xentr4>) a generovány PCR primery na amplifikaci těchto sekvencí. Následně bylo provedeno křížení dvou jedinců ze dvou inbredních linií Nigerian a Ivory Coast a dále jejich potomků, čímž vznikla druhá filiální generaci o více než 500 jedincích. Tito jedinci byli testováni PCR primery jednotlivých

SSR markerů a bylo analyzováno, které SSR markery jsou u nich polymorfní. Pro polymorfní markery byly následně syntetizovány fluorescenční primery pro multiplexní PCR reakci a kapilární analýzu amplifikovaných fragmentů u F2 generace. Získaná data jsou zpracována programem MAPMAKER a v současné době probíhá jejich ověřování metodou FISH.

### **3.3 Gynogenetické křížení**

Gynogenetické křížení je metoda umožňující jednodušší a rychlejší možnost získání a analýzy recesivních mutací než u tradičních protokolů, možnost vyhodnocení frekvence rekombinací a počáteční stupně genetického mapování (Johnson, 1996). Jednodušší a rychlejší proto, že obchází složitý proces inbredního křížení. Jeho výsledkem jsou embrya s pouze maternálním genomem (Krotoski, 1985; Hirsch et al, 2002).

#### **3.3.1 Produkce gynogenetických kříženců**

Vajíčka jsou při gynogenetickém křížení aktivována spermiemi se silně poškozenou DNA. Nejčastější postup u obojživelníků je ošetření spermií UV zářením. Inaktivace DNA lze však docílit i chemickým mutagenem či gama zářením (Chourrout, 1982). Výsledkem jsou haploidní embrya, která se ovšem vyvíjejí abnormálně a přežijí pouze několik dnů (Hirsch et al, 2002; Normaly et al, 2004).

Vzhledem k tomu, že k dokončení druhého meiotického dělení dochází u obojživelníků až po oplození, je možné generovat diploidní embrya vysokým hydrostatickým tlakem nebo pomocí chladového šoku, který zabrání odloučení druhého polového tělíska. U savců lze v rámci této metody použít některé antimitotické činidlo (<http://www.nimr.mrc.ac.uk/devbiol/zimmerman/xenopus/>). Tato diploidní embrya, pokud nenesou letální mutaci, jsou schopna přežít až do dospělosti (Tompkins, 1991).

Výsledný genom embrya je čistě maternální, ale ne kompletně homozygótní, protože je reprezentován rekombinačními produkty meiózy (Streisinger, 1986). Také frekvence fenotypů v gynogenetických diploidních embryích proto není zcela mendelovská (Hirsch et al, 2002).

### **3.3.2 Hemitetrádová analýza**

Meiotická tetrádová analýza je běžně používána při studiu genetické informace různých druhů kvasinek, hub i rostlin (Yang, 2008). Jde o analýzu rekombinací čtyř haploidních produktů dvou za sebou jdoucích meiotických dělení. Tato analýza umožňuje vyhodnotit, jak často se lokus segreguje v prvním či druhém meiotickém dělení a tedy jaká je vzdálenost mezi touto pozicí a centromerou (Johnson, 1995).

Protože rekombinace probíhá obvykle recipročně, stejně hodnotná data poskytne i hemitetrádová analýza, která hodnotí jeden z obou produktů I. meiotického dělení (po II. meiotickém dělení jsou to tedy produkty dvou, nikoliv čtyř chromatid). Pomocí hemitetrádové analýzy lze hodnotit vzniklá gynogenetická embrya a rekombinace v jejich genomu (Streisinger, 1986).

### **3.3.3 Meiotická interference**

K rekombinacím na homologních chromozómech během meiózy dochází s poměrně vysokou četností. Meiotická interference (crossover interference) způsobuje, že k tvorbě chiasmat (překřížení homologních chromozómů) dochází pravidelněji, než by bylo možné očekávat při jejich náhodném umístění podél chromozómů. Interference také zmenšuje četnost dvojitých rekombinací (de Boer et al, 2007). Meiotická interference může ovlivnit gynogenetické křížení ve dvou ohledech. Pokud je interference silná, dvojitě „crossing-over“ jsou potlačeny a dochází k akumulaci jednotlivých „crossing-overů“. Vzdálené lokusy budou tak převážně heterozygótní a homozygótní fenotyp se u těchto lokusů téměř nebude vyskytovat.

Naopak pokud by meiotická interference byla relativně slabá, recesivní mutace se budou u distálních lokusů díky vícenásobné rekombinaci projevovat podstatně častěji (Broman et al, 2002).

### **3.3.4 Specifický poměr rekombinací vzhledem k pohlaví**

U mnoha druhů se frekvence rekombinací liší mezi samci a samicemi. U většiny druhů platí, že u heterogametního pohlaví dochází k nižšímu počtu rekombinací v porovnání s pohlavím homogametním. Existující vazebné mapy ale předpokládají stejné rozložení rekombinací u samčí a samičí meiózy (Singer et al, 2002). Rozdíly v počtu rekombinací ve vztahu k pohlaví mohou narušit strategii gynogenetického mapování a promítnout se do gynogeneticky zjištěných vazebných vzdáleností. Pro relevantní výsledky



gynogenetického mapování je proto třeba porovnat četnost rekombinací u samců a samic na různých lokusech (Zimmerman, ústní sdělení).

### **3.3.5 Pozice centromery a genová vazba**

Velkou výhodou gynogenetického mapování je, že jediná samice s vhodným genetickým materiálem může poskytnout dostatečný materiál pro identifikaci určitého lokusu v rámci určitého úseku na chromozómu. Dále jsou gynogenetická embrya téměř vždy homozygótní v pozicích velmi blízkých centromere. Důvodem homozygótnosti centromerických pozic je absence crossing-overu v této oblasti a tudíž gynogenetická embrya obsahují obě sesterské chromatidy (Johnson, 1995; Hirsch et al, 2002). Krátký interval mezi centromerou a přilehlým lokusem poskytuje malou pravděpodobnost rekombinace s nesesterskou chromatidou a vznik heterozygótního lokusu. Frekvence rekombinací stoupá se vzdáleností od centromery, což zapříčiňuje nárůst počtu heterozygótů v těchto vzdálenějších pozicích na chromozómu (Thiebaud, 1984; Reinschmidt, 1985).

V případě, že lokus s recesivní mutací leží u heterozygótní samice v těsné blízkosti centromery, 50% jejích gynogenetických potomků ponese mutovaný fenotyp a příslušné markery v rámci vazebné mapy budou vykazovat vazbu (Thiebaud, 1984). Mutace na pozici více vzdálené od centromery inklinují k větší frekvenci crossing-overů, což se projevuje vyšším zastoupením heterozygótních potomků s wild-type fenotypem. Díky poklesu počtu embryí s mutantním fenotypem lze vypočítat pravděpodobnou vzdálenost pozice mutace od centromery (Reinschmidt, 1985).

## **3.4 Fyzické mapování genomu**

Fyzická mapa genomu ukazuje reálnou fyzickou vzdálenost mezi 2 lokusy, vyjádřenou počtem bazických párů. Historicky nejdříve vznikaly cytologické chomoromální mapy, v současné době je nejrozšířenější formou fyzického mapování *in situ* hybridizace (ISH).

### **3.4.1 Cytologické mapy**

První cytologické objevy se datují na přelomu 19. a 20. století, kdy došlo ke zdokonalení mikroskopických technik. Později zavedením pruhovacích technik vznikl další

systém klasifikace chromozómů a v rámci studií genomu různých organismů byly vytvářeny první cytologické mapy (Qu, 1989). Humánní cytogenetika získala důležité postavení v medicíně. Se zdokonalením molekulárních technik v biologii lze mluvit o studiu genetického materiálu na molekulární úrovni, především pomocí hybridizace *in situ* (ISH).

### 3.4.2 ISH – *In situ* Hybridization

ISH (*in situ* hybridizace) je metoda detekce DNA či RNA sekvence pomocí komplementární oligonukleotidové či polynukleotidové sondy. U klasické hybridizace sonda nasedá na izolovanou molekulu DNA či RNA, imobilizovanou na pevném či polopevném nosiči – gel, „blot“, nitrocelulóza apod. (Gall a Pardue, 1969). U metody „*in situ*“ probíhá hybridizace v morfologicky intaktní tkáni, v buňkách nebo na chromozómech, které jsou fixovány na mikroskopickém sklíčku (Tompsett et al, 2009). Metoda tak sdružuje standardní světelnou mikroskopii s detekcí hybridizace.

Podmínkou hybridizace je denaturace dvouvláknové DNA (dsDNA) na jednovláknovou DNA (ssDNA), na které ve specifických úsecích nasedá sonda. Vysoká teplota, která je k tomu potřebná, by mohla poškodit morfologii chromozómů. Proto se pro *in situ* hybridizaci používá formamid, který destabilizuje vodíkové můstky při nižší teplotě, než by odpovídalo bodu tání DNA ve vodném roztoku (Casey a Davidson, 1977).

Pro detekci nukleových kyselin pomocí ISH se obvykle používají radioaktivně značené sondy. Využití autoradiografie má ale několik nevýhod, jako je jejich cena či zvýšené nároky na bezpečnou manipulaci. Dobrým řešením se ukázal vývoj neradioaktivních sond, které mají značnou životnost, a jejich použití umožňuje rychlejší výsledky tam, kde radioaktivně značené sondy vyžadují týdny či měsíce latence. Neradioaktivní značení je obvykle detekované histochemickými či imunohistochemickými metodami. Nejvíce používané jsou sondy značené biotinem nebo digoxigeninem (Bloch, 1993). V současné době se ISH používá nejčastěji pro vizualizace mRNA v buňkách.

### 3.4.3 FISH – Fluorescence *In situ* Hybridization

FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) využívá fluorescenčně značené sondy, které usnadňují detekci chromozómů, fyzické mapování specifických sekvencí a detekci chromozomálních abnormalit. Principem metody je navázání fluorescenčně značeného fragmentu DNA přímo v chromozómu. Sonda specificky nasedne na komplementární úseky jednoho vlákna DNA po denaturaci této nukleové kyseliny. V posledních letech se

tato metoda stala jednou z nejdůležitějších metod molekulární biologie, cytogenetiky i lékařské diagnostiky (Trask, 1991; Sieben et al, 2007).

Pomocí FISH lze detekovat sondy 1 - 3 kbp velké, což odpovídá běžné velikosti jednoho genu. Byly publikovány i studie s detekcí sond menších než 1 kbp. Rozlišovací možnosti FISH závisí na povaze mapovaného materiálu. Lze mapovat interfázní jádro, mitotické chromozómy v profázi či metafázi, meiotické pachytenní chromozómy nebo rozvinutá vlákna DNA. Mitotické chromozómy jsou nejčastějším materiálem pro FISH mapování, kvůli své kondenzaci mají ale nejnižší rozlišovací možnosti a je třeba několik megabází rozestupů mezi dvěma mapovanými sekvencemi (Jiang a Gill, 2006). Oligonukleotidové sondy pro detekci rRNA mohou být menší, stačí zde 15 – 25 bp (Wagner et al, 2003).

Existují různé typy sond pro FISH a mnoho metod, jak zvýšit citlivost této metody. Signál sondy lze amplifikovat 10 - 100krát. Taková amplifikace přináší samozřejmě problém zvýšení signálů v pozadí a je nutno individuální optimalizace v jednotlivých laboratořích (Jiang a Gill, 2006).

#### 3.4.3.1 Typy FISH sond

FISH sondy lze rozdělit na místně specifické, celochomozomové a celogenomové, které se využívají pro komparativní FISH při studiu evoluce genomu (Jackson et al, 2000). Sondy mohou být různě dlouhé, od 20 - 40 bp po stovky kbp. Záleží především na cílové sekvenci, její znalosti a očekávané specifičnosti reakce. Důležitou roli hraje i síla vazby mezi sondou a cílovou sekvencí. Tu může ovlivnit koncentrace formamidu, solí, hybridizační teplota nebo pH.

Podle vlastností lze sondy rozdělit na několik typů: oligonukleotidové, ssDNA, dsDNA a RNA sondy. Oligonukleotidové sondy jsou připravovány chemickou syntézou z deoxyribonukleotidů. Jsou dlouhé asi 40 - 50 bazí, což je výhodné pro *in situ* hybridizaci, protože takto malé sondy se snadno dostávají do jader a chromozómů, hybridizují rychleji a pevněji a jejich příprava je cenově nenáročná. Nevýhodou je, že je nutné znát přesnou sekvenci cílové DNA a vzhledem k malé velikosti je citlivost této metody nižší (Bradley et al, 2008).

Jednovláknové DNA sondy jsou velké asi 200-500 bazí. Mohou být připraveny buď reverzní transkripcí mRNA, nebo PCR amplifikací s použitím jednoho primeru. Nevýhodou této techniky je vyšší cena, delší doba a náročnost přípravy. Dvouvláknové

DNA sondy jsou připravovány vložením sekvence do vektoru, který je inkorporován do bakterií a kde dochází k amplifikaci. Vektor s inzertem je z bakterií izolován a cílová sekvence vyštěpena restrikcími enzymy. Protože je sonda dvouvláknová, je před hybridizací nutná její denaturace (Nath a Johnson, 1998).

RNA sondy jsou používány výhradně pro vizualizaci ribozomální RNA, poly(A) RNA a mRNA v cytoplazmě. Jejich výhodou je především síla vazby dvouvláknové RNA (Molenaar et al, 2001).

Sondy pro FISH mohou být připraveny z kosmidových, BAC (Bacterial Artificial Chromosome), YAC (Yeast Artificial Chromosome) nebo PAC (P1-derived Artificial Chromosome, kombinace P1 fágového a BAC vektoru) knihoven. Bývají dlouhé několik desítek až stovek kb a mimo jiné obsahují sekvenci pro hledaný gen. Přítomnost repetitivních sekvencí v takto vytvořených sondách však zvyšuje riziko nespecifického signálu. Tento problém lze řešit inkubací sondy s neznačenou jadernou DNA studovaného organismu, případně s frakcí DNA obohacenou o repetitivní sekvence (Jiang a Gill, 2006).

#### 3.4.3.2 Značení FISH sond

Hybridizovanou sondu lze vizualizovat přímo, pokud byl během její syntézy použit nukleotid konjugovaný s některým z fluorochromů jako fluorescein izothiokyanát (FITC), tetrametylrodamin (TMR) apod. Tento přístup je dostatečný v případě lokalizace repetitivních sekvencí. Pro lokalizaci unikátní sekvence je však signál většinou příliš slabý (Speel et al, 1999).

Vyšší citlivosti detekce signálu lze dosáhnout nepřímou vizualizací sondy, kdy značený nukleotid slouží jako hapten (látko, která je schopna vyvolat specifickou imunitní odpověď po navázání na makromolekulový nosič) pro reakci s příslušnou protilátkou konjugovanou s fluorochromem. Mezi nejpoužívanější hapteny patří biotin, digoxigenin či některá z fluorescenčních sloučenin. Značení obvykle probíhá pomocí PCR či nick translací (značení DNA radiozotopy metodou posunu zlomu). Ani tento přístup však často není dostatečný k identifikaci signálu v případě použití krátkých sond (Jiang a Gill, 2006). Využívají se proto další systémy buďto amplifikace signálu, nebo amplifikace samotné cílové sekvence.

### 3.4.3.3 Amplifikace signálu FISH pomocí

#### 3.4.3.3.1 CARD – Catalyzed Reporter Deposition

Metodou CARD (Catalyzed Reporter Deposition), nebo také TSA (Tyramide Signal Amplification), lze až 1000krát amplifikovat signál ISH či FISH (Schriml et al, 1999). CARD byla původně vyvinuta pro zesílení signálu při imunoblotingu a ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) testech (Bobrow et al, 1989). Postupem času se však metoda osvědčila v celé řadě dalších aplikací.

Systém CARD (TSA) tvoří tyramid (fenolická sloučenina) a enzym křenová peroxidáza (horseradish, HRP). Reakcí HRP s tyramidem vzniká jeho volný radikál, který se kovalentně váže na struktury bohaté na elektrony, jakými jsou tyrozinové zbytky v proteinech (Pernthaler et al, 2002). Kvůli extrémě krátké životnosti tyramidových radikálů se vazba uskuteční pouze v nejbližším okolí a nedochází tak k nežádoucí difuzi. Koncentrace použitého tyramidu musí být nízká, aby nedocházelo k jeho dimerizaci. Další variantou je komplex specifické biotinylované sondy s konjugátem streptavidin-HRP. (Van Heusden et al, 1997; Pernthaler et al, 2002).

Výhodou této metody je, že k amplifikaci signálu dochází po hybridizaci sondy a promývání preparátu. Tento postup zajišťuje specifitu hybridizace sondy (Speel et al, 1999).

### 3.4.3.4 Amplifikace cílové sekvence FISH

#### 3.4.3.4.1 PRINS – Primed *In situ* labelling

Metoda PRINS (Primed *In situ* labelling) byla poprvé uveřejněna Koch et al (1989). Princip techniky spočívá v nasednutí jednoho neznačeného primeru na denaturovanou chromozomální DNA a s následnou *in situ* elongací pomocí termostabilní DNA polymerázy. Reakční směs obsahuje jeden nebo více značených nukleotidů. Značené mohou být fluorescenčně, díky čemuž je možné po ukončení reakce ihned pozorovat místo syntézy DNA. Při nepřímém značení je nejčastější použití nukleotidů značených digoxigeninem nebo biotinem. V tomto případě je reakční produkt nutné detekovat pomocí fluorescenčně značené protilátky (Koch et al, 1989). Na rozdíl od FISH není pro PRINS nutné připravovat značené sondy.

Metoda PRINS se uplatnila především v lokalizaci repetitivních sekvencí chromozómů, jako jsou například telomerické tandemově uspořádané repetice

(TTAGGG)<sub>n</sub>, vykazující vysokou konzervaci v evoluci (Krejci a Koch, 1999). Gosden et al (1991) použili Alu specifické primery v PRINS reakci ke značení lidských chromozómů. Alu repetice se v genomu nacházejí přibližně ve 300 až 900 tisících kopiích, nerovnoměrně rozložených v tzv. Alu lokusech. Koch et al (1989) pro rozlišení některých lidských chromozómů použili techniku PRINS na základě amplifikace  $\alpha$ -satelitní DNA. Její základní jednotkou je 171 bp dlouhá sekvence nacházející se v centromerických oblastech chromozómů všech primátů.

#### 3.4.3.4.2 *In situ* PCR

Zvýšení citlivosti umožňuje metoda *In situ* PCR, nebo také „cycling-PRINS“ (C-PRINS). Tato metoda spočívá v použití dvou primerů ohraničených detekovanou sekvencí a v opakování reakčních cyklů (denaturace, annealing, extenze) stejně jako v případě PCR reakce (Kubálková et al, 1997). *In situ* PCR je nejčastěji aplikována na tkáních fixovaných ve formalinu a pro tyto podmínky je technika nejlépe optimalizovaná. Z pohledu lokalizačních experimentů se *in situ* PCR ukázala být vhodná pro detekci repetitivních telomerických sekvencí stejně jako jedinečných sekvencí (Harrer et al., 2001).

Přímo v buňce nebo na tkáňovém řezu katalyzuje termostabilní DNA polymeráza amplifikaci hledané sekvence na detekovatelnou úroveň. Na druhou stranu některé práce (Sibony et al. 1995, Sperry et al. 1996, Speel et al. 1999) tento princip zpochybňují, protože stejných výsledků dosáhli i pouhým opakovaným zahříváním vzorku bez přítomnosti termostabilní DNA polymerázy.

### 3.4.4 Fyzické mapování u *X. tropicalis*

Prvním fyzicky mapovaným genem u *X. tropicalis* byl gen MDH2 (mitochondriální malátdehydrogenáza). Autoři identifikovali lokus v subcentromerické oblasti q ramene chromozómu 3 (Krylov et al, 2007). Předchozí fyzické mapování MDH2 u *X. laevis* byly 2 paralogní geny MDH2 lokalizovány do chromozómů 3 a 8 (Tlapáková et al, 2005). Srovnání výsledků těchto 2 studií naznačuje společný evoluční původ identifikovaných chromozómů.

Sekvenace genomu *X. tropicalis* již nyní poskytuje mnoho scaffoldů. Lokalizace genů pomocí FISH-TSA techniky umožňuje přiřazení jednotlivých scaffoldů k chromozómům, kontrolu kontinuity scaffoldů a kontrolu jejich umístění ve formující se vazebné mapě. V laboratoři školitele se již podařilo přiřadit všech 10 vazebných skupin

k chromozómům *X. tropicalis* a zjistit umístění clusterů (Krylov, ústní sdělení). Dalším cílem je určení centromerických markerů a ověřit pokrytí chromozómů příslušnými LG a clustery.

**Tabulka 1** - Přiřazení vazebných skupin k chromozómům *X. tropicalis* (Krylov, ústní sdělení)

LG 1	LG 2	LG 3	LG 4	LG 5	LG 6	LG 7	LG 8	LG 9	LG 10
		Cluster D		Cluster E		Cluster C	Cluster F	Cluster A	Cluster B
Chr.1	Chr.8	Chr.6	Chr.5	Chr.10	Chr.2	Chr.3	Chr.9	Chr.4	Chr.7

## 4. MATERIÁL

### 4.1 Biologický materiál

- *X. tropicalis*, kmen Ivory Coast, chov PřF UK.
- Tkáňová kultura testikulárních buněk z varlat samců *X. tropicalis*, kmen Ivory Coast, chov PřF UK.
- CEMO TOP10 bakterie *Escherichia coli* (Invitrogen)

### 4.2 Použité roztoky

H<sub>2</sub>O použitá v roztocích byla vždy destilovaná.

- Etidiumbromid: 1 mg/1 ml H<sub>2</sub>O
- BFM (bromfenolová modř): 50 % glycerol; 0,13 M EDTA-NaOH; 0,12 % BFM
- Krystalviolet: 2 mg/1 ml H<sub>2</sub>O
- 6x Loading dye solution (Fermentas)
- 2/3 XT medium: 150 ml L-15 medium (Leibovitz medium, Sigma); 30 ml 5x konc. RPMI medium (Sigma); 3 ml glutaminu; 7,8 ml NaHCO<sub>3</sub>; 225 ml gentamycinu; do 450 ml H<sub>2</sub>O
- Hypotonizační roztok: 60 mM NaCl, 1 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>; pH = 7 - 7,5
- Fixační roztok: CH<sub>3</sub>OH a CH<sub>3</sub>COOH v poměru 3:1
- 5x konc. TBE (Tris-borát-EDTA): 200 mM Tris; 10 mM EDTA; 450 mM H<sub>3</sub>B<sub>3</sub>O<sub>3</sub>, pH = 8,0
- 1x PBS (fosfátový pufr): 2,25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 136 mM NaCl; 1,5 mM KCl; pH = 7,35
- 2x SSC pufr: 150 mM NaCl; 15 mM sodium citrate; pH = 7,0
- 1x TNT pufr: 0,1 M Tris/HCl; 0,15 M NaCl; 0,5% Blocking reagent (kasein); pH = 7,0
- TNB pufr: 0,1 M Tris/HCl; 0,15 M NaCl; 0,05% Tween 20; pH = 7,5
- Mowiol DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol): 6 g glycerolu; 2,4 g Mowiol 4.88 (Sigma); 6 ml H<sub>2</sub>O; 12 ml 0,2 M Tris-HCl; 0,5 µg/ml DAPI (Sigma)



### 4.3 Kity

- RNeasy Mini Kit (50) (Quiagen)
- RevertAid H Minus First Strand cDNS Synthesis Kit (Fermentas)
- QIAquick Gel Extraction Kit (250) (Qiagen)
- NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel)
- Zippy Plasmid Miniprep II Kit (Zymo Research)
- CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas)
- DecaLabel DNA Labeling Kit (Fermentas)
- TSA-Plus Tetramethylrhodamine System (PerkinElmer)

### 4.4 Přístroje

- Centrifuga MiniSpin Plus (Eppendorf)
- Centrifuga Hettich Universal 32 R (Hettich Zentrifugen)
- Elektroforetický zdroj Consort E122 (Consort)
- Vortex Ika Works, Minishaker MS1 (Ika Works)
- Vodní lázeň Techne FTE 10DE (Techne, Cambridge)
- Termocyklér Techne FTGRAD FD (Techne, Cambridge)
- Termocyklér PTC 100 (MJ Research Inc.)
- XP Termocyklér (Bioer)
- Výchřevná plotéka (Vazas)
- Třepačka Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf)
- Spektrofotometr Shimadzu UV-1601 (Shimadzu Corporation)
- NanoDrop Spectrophotometr ND-100
- UV Transiluminátor TS-20E, 254 nm (UVP, ČR)
- Světelný zdroj Olympus Optical CO, LTD (Olympus)
- Fluorescenční mikroskop Olympus BX 40 (Olympus)
- CCD (z angl. Charge Coupled Device) černobílá kamera SPT-M320CE (Sony Corporation)
- Programy pro zpracování a analýzu obrazu DipsW 5.0 a ACC Image Analyser 5.0 (SOFO)

## 5. METODY

### 5.1 Příprava značené sondy pro FISH

#### 5.1.1 Navržení primerů pro PCR

Na základě dat z gynogenetického křížení, poskytnutých Dr. Zimmermannem z laboratoře National Institute for Medical Research v Londýně, jsem vybrala markery, které nejvíce odpovídaly gynogenetické poloze centromer u jednotlivých chromozómů a u kterých byl znám příslušný scaffold. Dále jsem vybrala markery, které se vyskytují na koncích vazebných map a ještě nebyly v laboratoři školitele mapovány, aby bylo možné určit pokrytí chromozómů jednotlivými LG. Brala jsem na zřetel scaffoldy, které se podle vazebné mapy SSR markerů (<http://tropmap.biology.uh.edu>) vyskytují pouze v dané vazebné skupině a pouze jednou, bylo-li to možné. Dávala jsem přednost dlouhým scaffoldům (nízké pořadové číslo).

V příslušných scaffoldech jsem pomocí genomové databáze Ensembl ([http://www.ensembl.org/Xenopus\\_tropicalis/index.html](http://www.ensembl.org/Xenopus_tropicalis/index.html)) vyhledala vhodné geny a zjistila, v jakých orgánech jsou u *X. tropicalis* exprimovány pomocí databáze UniGene na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>. Vybrala jsem takové geny, které jsou exprimovány v játrech, vaječnících či ledvinách.

K těmto genům jsem pomocí internetové aplikace Primer 3 verze 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) navrhla levé a pravé (F a R) primery pro PCR reakci ve velikosti okolo 20 bp tak, aby sekvence mezi nimi byla součástí exonů genu a pohybovala se v rozmezí 1 000 – 1 500 bp. Optimální teplota anealingu primerů je 60°C.

#### 5.1.2 Izolace RNA z tkání *X. tropicalis*

Tkáň z jater, ledvin a vaječníků jsem zpracovala pomocí RNeasy Mini Kit (50) (Quiagen), RNA jsem eluovala do 50 µl injekční H<sub>2</sub>O. Bylo třeba stanovit koncentraci izolované RNA. To jsem provedla spektrofotometricky při vlnové délce 260 nm. Vzorek byl 100x zředěný v 600 µl H<sub>2</sub>O. Získaná RNA byla uskladněna v tekutém dusíku při teplotě -70°C.

RNA: A (260 nm) = 1 => c = 44 µg/ml.

### 5.1.3 Reverzní transkripce

Metodou reverzní transkripce jsem v termocykléru připravila pomocí RevertAid H Minus First Strand cDNS Synthesis Kitu (Fermentas) první vlákno cDNA.

#### Schéma reakce:

- RNA o objemu 3 µg
- Oligo (dT)<sub>18</sub> Primer (0,5 µg/µl) 1 µl
- Doplněno injekční H<sub>2</sub>O do 12 µl

Směs jsem promíchala, centrifugovala a inkubovala 5 minut v 70°C. Po inkubaci jsem zkumavku okamžitě zchladila na ledu.

- 5x Reaction buffer 4 µl
- dNTP mix (10 mM) 2 µl
- RiboLock RNase inhibitor (20 u/µl) 1 µl

Opět jsem vše promíchala, stočila a inkubovala 5 min v 37°C.

- RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/µl) 1 µl

Směs o celkém objemu 20 µl jsem ještě jednou zamíchala, stočila a inkubovala 60 min v 42°C, poté 10 min v 70°C a okamžitě zchladila na ledu. Výtěžek reverzní transkripce jsem uchovávala při -20°C, nejdéle však 6 měsíců.

### 5.1.4 PCR amplifikace cDNA

Získanou cDNA jsem amplifikovala pomocí specifických primerů metodou PCR.

#### Reakční směs pro PCR reakci:

- Taq DNA polymerase (recombinant) 5 u/ µl (Fermentas) 1 µl
- 10x Taq Buffer with KCl (Fermentas) 5 µl
- MgCl<sub>2</sub> (25 mM) 3 µl
- dNTP mix 10mM (Fermentas) 1 µl
- F primer o koncentraci 25 mM (Invitrogen) 2 µl
- R primer o koncentraci 25 mM (Invitrogen) 2µl
- cDNA produkt reverzní transkripce 1 µl
- Injekční H<sub>2</sub>O 35 µl

Reakční směs jsem připravovala na ledu, centrifugovala 10 s při 14 000 ot./min a převrstvila ji parafínovým olejem. Při přípravě více vzorků jsem připravovala premix. Na cycleru jsem použila program „UNIV“. PCR amplifikáty jsem skladovala při -20°C.

**Tabulka 2 - Teplotní schéma PCR reakce**

Krok	Teplota	Čas	Počet opakování
Denaturace	94°C	1 min	35
Nasednutí primerů	60°C	2 min	
Syntéza	72°C	2 min	
Závěrečná syntéza	72°C	5 min	1

### 5.1.5 Elektroforéza na agarovém gelu (ELFO)

Kontrolu PCR amplifikace jsem prováděla na 1 % agarózovém gelu s etidumbromidem (EtBr) v koncentraci 1 µg/1 ml gelu. Na gel jsem nanesla předem namíchaných 5 µl PCR amplifikátu s 5 µl H<sub>2</sub>O a 3 µl bromfenolové modři (BFM). Jako velikostní DNA marker jsem použila Gene Ruler DNA Ladder mix (Fermentas). Elektroforéza probíhala v TBE pufru pod stálým napětím 90 V. Vzorky jsem analyzovala na UV transiluminátoru při vlnové délce 254 nm a snímala CCD černobílou kamerou.

### 5.1.6 Izolace PCR amplifikátu z agarového gelu

PCR amplifikát jsem izolovala opět na 1% agarózovém gelu. Do izolačního gelu jsem přidala krystalviolet v koncentraci 1,6 µg/1 ml gelu, ke vzorkům krystalvioletový Loading dye 6x purf. Fragment DNA, skalpelem vyříznutý z agarózového gelu, jsem zvažila a umístila do zkumavky. Pomocí QIAquick Gel Extraction Kitu (250) (Qiagen) jsem cDNA vyizolovala a eluovala do 50 µl injekční H<sub>2</sub>O. Pomocí gelové elektroforézy jsem opět zkontrolovala získanou cDNA. Tu jsem pak dále skladovala při teplotě -20°C.

### 5.1.7 Klonování PCR amplifikátu přes plazmidový vektor

Přečištěný PCR produkt jsem vložila do plazmidového vektoru pJET 1.2, který je součástí CloneJET PCR Cloning Kitu (Fermentas). Plazmidy s vloženým cDNA fragmentem jsem amplifikovala v chemokompetentních bakteriích *Escherichia coli* kmene TOP 10 (Invitrogen).

#### Schéma klonování:

Do 1,5 ml zkumavky jsem smíchala produkt PCR amplifikace a enzym pro zatupení přesahujících konců cDNA fragmentů, které zanechává použitá Taq polymeráza.

- 2x Reaction Buffer 5  $\mu$ l
- Produkt PCR amplifikace 1  $\mu$ l
- Injekční H<sub>2</sub>O 2,5  $\mu$ l
- DNA blunting enzyme 0,5  $\mu$ l

Obsah zkumavky jsem promíchala, centrifugovala a temperovala 5 minut při 70°C. Poté jsme směs zchladila na ledu a přidala plazmidový vektor a T4 ligázu, aby vektor a cDNA fragment spojila.

- pJET 1.2/blunt cloning vector (50 ng/ $\mu$ l) 0,5  $\mu$ l
- T4 DNA ligáza (5 u/ $\mu$ l) 0,5  $\mu$ l

Opět jsem promíchala a centrifugovala obsah zkumavky. Ligační směs jsem nechala při pokojové teplotě stát 15 - 20 minut. 3  $\mu$ l této směsi jsem přidala k 25  $\mu$ l suspenze chemokompetentních bakterií, lehce promíchala poklepáním prsty a vše nechala inkubovat 30 minut na ledu. Následoval 30-ti sekundový teplotní šok při teplotě 42°C a ustálení na ledu 2 min. Po ustálení jsem k bakteriím přidala 250  $\mu$ l S.O.C. media (Invitrogen).

Po dobu 1 hodiny jsem bakterie za stálého třepání inkubovala při 37°C. 30  $\mu$ l buněčné suspenze jsem vysela na agarové plotny s ampicilinovým antibiotikem (2  $\mu$ l/ml agaru) pro pozitivní selekci a inkubovala přes noc v termostatu při 37°C. Vybrané 2 kolonie jsem přečárkovala opět na agarové plotny s ampicilinem a kultivovala přes noc v termostatu při 37°C.

Narostlé klony vybraných kolonií jsem z agarové plotny setřela skalpelem a izolovala jsem plazmidovou DNA kitem Nucleospin Plasmid (Macherey–Nagel), popř. kitem Zyppy Plasmid Miniprep II Kit (Zymo Research), a extrahovala ji do 50  $\mu$ l injekční H<sub>2</sub>O, pro větší účinnost zahřáté na 70°C.

### 5.1.8 Restrikční štěpení plazmidové DNA (pDNA)

Detekci přítomnosti PCR amplifikátu v plazmidu jsem u vybraných klonů ověřila restrikčním štěpením pomocí restriktázy BglII, jejíž štěpící sekvence je přítomna v polylinkeru.

Pro restrikci jsem používala dva typy restriktáz, běžné a tzv. rychlé (FAST). Při použití běžných restriktáz jsem inkubovala reakční směs 1,5 hodiny při teplotě 37°C, u rychlých byla délka restrikce 15 - 20 minut. Reakci jsem zastavila přidáním 6 µl BFM a ihned použila pro elektroforetickou analýzu na 1 % agarovém gelu s EtBr. Analyzovala jsem délku vyštěpených fragmentů a porovnávala ji s internetovou databází <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>, kde lze zjistit, zda fragment cDNA obsahuje vnitřní štěpící místa pro použitou restriktázu.

#### Restrikční směs

- 10x Buffer 0 with BSA / 10x FastDigest pufr 2 µl
- Restriktáza BglII/ FAST restriktáza BglII 1 µl
- pDNA 3 µl
- Injekční H<sub>2</sub>O 15 µl

### 5.1.9 Měření koncentrace pDNA

Koncentraci pDNA jsem zjišťovala na Spektrofotometru Shimadzu UV-1601 (Shimadzu Corporation) při vlnové délce 260 nm, popřípadě na NanoDrop Spectrophotometru ND-100.

DNA:  $A(260\text{ nm}) = 1 \Rightarrow c = 50\text{ }\mu\text{g/ml}$ .

### 5.1.10 Sekvenace

Další kontrolou cDNA fragmentu, amplifikovaného klonováním přes plazmidový vektor, byla sekvenace. Namíchanou směs pDNA s primerem jsem posílala do sekvenační laboratoře PřFUK.

#### Sekvenační směs:

- pDNA v objemu 1 µg
- R nebo F pJET 1.2 Sequencing Primer (10 mM) 0,32 µl
- Doplněno injekční H<sub>2</sub>O do 14 µl

### 5.1.11 Amplifikace cDNA metodou rePCR

Amplifikovaný cDNA fragment z plazmidového vektoru jsem dále amplifikovala pomocí rePCR reakce.

Reakční směs pro rePCR reakci:

- Taq DNA polymerase (recombinant) 5 u/  $\mu$ l (Fermentas) 0,5  $\mu$ l
- 10x long PCR pufr s  $Mg^{2+}$  (Fermentas) 5  $\mu$ l
- $MgCl_2$  (25 mM) 3  $\mu$ l
- dNTP mix 10 mM (Fermentas) 1  $\mu$ l
- F primer o koncentraci 25 mM (Invitrogen) 2  $\mu$ l
- R primer o koncentraci 25 mM (Invitrogen) 2  $\mu$ l
- pDNA (koncentrace 5 ng/  $\mu$ l) 1  $\mu$ l
- Injekční  $H_2O$  35,5  $\mu$ l

Reakční směs jsem připravovala na ledu, centrifugovala a převrstvila ji parafínovým olejem. Při přípravě více vzorků jsem připravovala premix. Na cykleru jsem použila program „CDNAAMP“. PCR amplifikáty jsem opět kontrolovala pomocí gelové elektroforézy, spektrofotometricky změřila jejich koncentraci a izolovala na 1 % agarovém gelu s krystalvioletí.

**Tabulka 3 - Teplotní schéma rePCR reakce**

Krok	Teplota	Čas	Počet opakování
Denaturace	94°C	1 min	1
Denaturace	94°C	30 s	30
Nasednutí primerů	60°C	2 min	
Syntéza	72°C	2 min	
Závěrečná syntéza	72°C	5 min	1

### 5.1.12 Značení cDNA

Amplifikovaný cDNA produkt jsem značila nick translací pomocí DecaLabel DNA Labeling Kitu (Fermentas) podle schématu:

- cDNA o objemu 1 µg
- Decanucleotide in 5x Reaction Buffer 10 µl
- Doplněno injekční H<sub>2</sub>O do 42 µl

Obsah zkumavky jsem promíchala, centrifugovala a inkubovala 10 min ve vroucí vodě. Po zchlazení na ledě jsem přidala další části značící směsi:

- Non-radioactive labeling mix 5 µl
- DIG-11-dUTP 1,75 µl
- Klenow fragment, exo<sup>-</sup> (5 u/µl) 1 µl

Vše jsem opět promíchala, centrifugovala a inkubovala 20 hodin ve 30°C.

Po inkubaci jsem reakci zastavila přidáním 1 µl EDTA 500mM, přidala 50 µl isopropanolu kvůli malé velikosti úseků cDNA a přečistila pomocí QIAquick Gel Extraction Kitu (250) (Qiagen). Značenou sondu jsem eluovala do 50 µl injekční H<sub>2</sub>O.

## 5.2 Zpracování buněčného materiálu z tkáňové kultury

### 5.2.1 Kultivace buněčné testikulární kultury in vitro

Buňky byly pěstovány v kultivačních lahvích s 20 ml 2/3 XT media při teplotě 28°C a 6% koncentraci CO<sub>2</sub>. Buněčná kultura byla 2x týdně pasážována dle standardních postupů.

### 5.2.2 Synchronizace buněčného dělení a sběr buněk

Dělení buněčné kultury jsem zastavila specificky v mitotické fázi buněčného cyklu přidáním roztoku kolchicinu (výsledná koncentrace = 0,2 µg/ml média). Buňky jsem takto inkubovala 4,5 hodiny v CO<sub>2</sub> inkubátoru při 28°C. Poté jsem kultivační médium z buněk slila a do každé kultivační jsem přidala lahve á 5 ml 10x ředěného roztoku trypsin/EDTA v 2/3 PBS.

Kulturu jsem kontrolovala pod invertovaným mikroskopem. Po uvolnění buněk od podkladu, cca 7 min, jsem účinek trypsinu zastavila á 0,5 ml 5x konc. FCS (Fetal Calf Serum, telecí fetální sérum) (Sigma).



### **5.2.3 Zpracování buněk pro nakapání**

Sebrané buňky jsme centrifugovali 5 min při 900 ot./min. Odebrala jsem supernatant, sediment promyla 10 ml 2/3 PBS a centrifugovala opět 5 min při 900 ot./min. Po odebrání supernatantu jsme k sedimentu přidali 2 ml prehypotonizačního roztoku, resuspendovala buňky a po stěnách pomalu přidala 3,26 ml H<sub>2</sub>O (hypotonizace 38 mmol). Zkumavku jsem několikrát promíchala jejím opatrným převrácením a inkubovala 5 min při pokojové teplotě. Suspenzi jsem prefixovala přidáním 1,52 ml fixáže (metanol:kyselina octová v poměru 3:1), převrácením zkumavky promíchala a inkubovala dalších 15 min. Následovala centrifugace 5 min, 900 ot./min. Supernatant jsem odebrala a buňky fixovala 5 ml čerstvé fixáže. Obsah zkumavky jsem rozmíchala probubláním Pasteurovou pipetou, inkubovala 10 min a následně centrifugovala 5 min, 900 ot./min. Celý cyklus fixace promývání jsem zopakovala ještě 2x, vždy s čerstvou fixází. Po posledním stočení jsem odebrala supernatant do objemu potřebného pro nakapání.

Takto zpracované buňky, lze uchovávat při -20°C, je však třeba pravidelně měnit fixační roztok.

## **5.3 FISH**

### **5.3.1 Příprava preparátů**

Připravenou buněčnou suspenzi jsem nakapala z výšky 1 metr na odmaštěná podložní skla. Později jsem zjistila, že stačí kapat z výšky cca 10 cm, což je snazší a stejně účinné pro dobrou vizualizaci mitotických chromozómů. Preparáty jsem nechala schnout na vyhřívané plotýnce při 37°C až do vypaření většiny fixáže, do podoby tzn. „sandy surface“ – nakapaná oblast se jeví jako by byla posypaná jemným pískem. Poté jsem preparáty ponořila na 2 vteřiny do kyvety s 50 ml 50% kyseliny octové. Tento krok je významný z důvodu odstranění zbytků cytoplazmy. Preparáty jsem nechala doschnout na vyhřívané plotýnce. Dostatečné zastoupení mitóz jsem kontrolovala obarvením jednoho preparátu 5% Giemsou po dobu 8 min. Mitózy jsem prohlédla a spočítala pod světelným mikroskopem, abych mohla případně korigovat koncentraci buněčné suspenze pro další nakapání.

Po zaschnutí jsem preparáty ošetřila roztokem pepsinu (Sigma-Aldrich), 5 min při 37°C. Výsledná koncentrace pepsinu byla 50 µg/1 ml předehrátého roztoku 0,01 M HCl; 3

mM KAc, pH = 4,6. Preparáty jsem vkládala v 10 s intervalech a působení pepsinu jsem po 5 min zastavila vložením preparátů do kyvety s PBS.

Preparáty jsem promyla 5 min v 1x PBS v Petriho misce a postfixovala ve 2% paraformaldehydu po dobu 30 min při RT. Po té jsem preparáty znovu promyla 3 x 5 min v 1x PBS, inkubovala dalších 30 min v 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v 1x PBS pro inaktivaci endogenních peroxidáz a znovu promyla 3 x 5 min v 1x PBS. Poté jsme skla opláchla destilovanou H<sub>2</sub>O. Následovala dehydratace ve stoupající řadě metanolu (70%, 90%, 100%) vždy 3 min za stálého třepání a uschnutí preparátů na vzduchu.

Během všech promývání v Petriho misce jsem preparáty vždy třepala na třepáče, objem promývacího roztoku byl cca 100 ml. Inkubace probíhaly v kyvetě o objemu 50, resp. 80 ml, dle počtu preparátů.

### **5.3.2 Hybridizace**

Na suché preparáty jsem aplikovala 50 µl hybridizační směsi pro FISH na každé sklo:

- Deionizovaný formamid (Sigma) 25,0 µl
- 20x SSC roztok 5,0 µl
- Značená cDNA sonda 2,0 µl
- Injekční H<sub>2</sub>O 18,0 µl

Preparáty s hybridizační směsí jsem překryla krycím sklem, denaturovala v termocykleru (vyhřívaná destička) 5 min při 70°C a inkubovala přes noc v termostatu při 37°C, 12 - 16 hod, ve vlhké komůrce se 30 ml 50% formamidu.

### **5.3.3 Posthybridizační promytí**

Po hybridizaci jsem preparáty vyjmula z vlhké komůrky a odmyla nespecificky navázanou sondu inkubací v 70 ml roztoku 50% p.a. formamidu v 2x SSC, pH 7, 5 min při 42°C. Proces jsem dvakrát opakovala, vždy s novým promývacím roztokem. Dále jsem preparáty promyla 3 x 5 min ve 2x SSC a 1 x 5 min v 1x TNT, vše v Petriho misce při pokojové teplotě.

### **5.3.4 Vizualizace a amplifikace signálu**

Na skla jsem po promytí aplikovala á 1 ml TNB pufru a inkubovala je ve vlhké komůrce při pokojové teplotě. Po 30 min jsem TNB pufr slila, na skla aplikovala á 1 ml antidigoxigeninové protilátky konjugované s peroxidázou (Anti-digoxigenin-POD Fab

fragmenty, Roche) ředěné 1 000x v TNB pufru a centrifugované 5 min při 14 000 ot./min. Preparáty jsem inkubovala dalších 60 min. Poté jsem protilátku slila, skla 3x opláchla v 1x TNT roztoku a promyla v Petriho misce 3 x 5 min v TNT.

Pro amplifikaci signálu jsem použili TSA – Plus Tetramethylrhodamine System (PerkinElmer) dle následujícího schématu:

- 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v 1x CARD Buffer 0,33 µl
- 1x Plus Amplification Diluent 98 µl
- TMR Amplification Reagent 2 µl

Výsledný roztok jsem aplikovala na preparáty, překryla krycím sklem a nechala ležet 10 min ve tmě při pokojové teplotě. Preparáty jsem pro odplavení krycích skel 3x opláchla 1x TNT. Následně jsem je promyla 3 x 5 min v Petriho misce s 1x TNT, opláchla destilovanou H<sub>2</sub>O a nakonec promyla 3 min v destilované H<sub>2</sub>O. Preparáty jsem nechala uschnout ve tmě a montovala do mowiol/DAPI po 50 µl na každé sklo. Hotové preparáty jsem buďto hned porozovala, nebo je uchovávala při teplotě 4°C.

### 5.3.5 Pozorování a zpracování signálů

Preparáty jsem pozorovala pod fluorescenčním mikroskopem. Obrazy mitóz a FISH signálů jsem snímala CCD černobílou kamerou, fotila jsem zvlášť specifické signály, zvlášť mitotické chromozómy. Pro určení jednotlivých chromozomů jsem použila karyotyp *X. tropicalis*, popsáný v Tymowska, 1973.

Pro zpracování a analýzu obrazu jsem použila software DipsW 5.0 a ACC Image Analyzer 5.0.

### 5.3.6 Analýza získaných dat

Hodnotila jsem pouze metafázní chromozómy vykazující specifický signál, ideálně na obou chromatidách, a to nejméně z 6 nezávislých mitóz. Chromozómy jsem identifikovala na základě p/q indexu (poměr délky ramen p a q daného chromozómu). Pozici FISH-TSA signálu jsem určovala měřením jeho relativní vzdálenosti od centroméry vzhledem k délce celého ramene (RCD, Relative Centromere Distance). Z jednotlivých měření RCD jsem pro každý signál počítala aritmetický průměr, směrodatnou odchylku a konfidenci na hladině významnosti:  $\alpha = 0,05$ .

RCD měření jsem prováděla pomocí programu ACC image Analyzer 5.0, data z měření jsem zpracovala v programu Microsoft Excel.

## 6. VÝSLEDKY

### 6.1 Vyhledání a PCR amplifikace vhodných cDNA markerů

V první fázi byly fyzicky mapovány cDNA markery v těch oblastech, které byly dosud z větší části nemapované. Důvodem bylo ověření správnosti údajů ve vazebné mapě, zjištění orientace vazebných skupin a přibližného rozsahu vazebné mapy. Během tohoto mapování jsem získala celkový přehled o pokrytí chromozómů vazebnou mapou.

Na základě dat z gynogenetického křížení, poskytnutých Dr. Zimmermannem z laboratoře National Institute for Medical Research v Londýně, byly dále vybrány markery, které nejvíce odpovídaly odhadované poloze centromer u jednotlivých chromozómů a u kterých byl znám příslušný scaffold.

Později jsem takto vybrala i markery, které se vyskytují na koncích vazebných map a ještě nebyly mapovány v rámci předchozích prací v laboratoři školitele.

**Tabulka 4** - centromerické markery sestavené na základě výsledků z gynogenetického křížení, data poskytla laboratoř National Institute for Medical Research, Londýn.

VAZEBNÁ SKUPINA	MARKER	POZICE NA VAZEBNÉ MAPĚ (cM)	GYNOGENETICKÁ VZDÁLENOST OD CENTROMERY	POČET HOMOZYGÓTŮ / CELKOVÝ POČET
LG1	019D06	66,14	< 1 cM	60 / 60
LG2	025H10	49,10	1,2 cM	42 / 43
LG3	023G03	50,58	1,3 cM	3 / 115
LG4	010E04	52,00	1 cM	51 / 52
LG5	049c11	49,78	1,4 cM	34 / 35
LG6	016H09	0,00	< 1 cM	16 / 16
LG7	047F06	58,54	< 1 cM	50 / 50
LG8	017G07	53,51	1,3 cM	75 / 77
LG9	026H07	19,83	< 0,9 cM	53 / 55
LG10	036H11	2,34	< 1,5 cM	25 / 26

Celkový seznam navržených primerů je shrnut v Tabulce 5. Kódy genů jsou katalogová označení z databáze <http://www.ensembl.org/index.html>.

LG2	LG1	LG1	VAZEBNÁ SKUPINA
FBXL7 (ENSXETG00000007541)	Adhlb (ENSXETG00000010166)	EXOC1 (ENSXETG00000021068)	NÁZEV GENU
46	229	107	SCAFFOLD
49,10 – 51,83 cM	63,33cM	79,98 – 83,65 cM	PŘEDPOKLÁDANÁ POLOHA NA VAZEBNÉ MAPĚ
923 bp	1 066 bp	1 448 bp	DÉLKA SEKvence VČETNĚ PRIMERŮ
ACTGCCCGATCAATGTATCA	CCCTTCAGCATTGAGGACAT	TCTCCAATGCAGAGGCTTTT	F (FORWARD) PRIMER
CGTTCAGCATCTGTAGGTCAA	AATACAAAACGGTGCGAAGG	GCCAACTTTGCTTTTCTTCG	R (REVERSE) PRIMER
LG2	LG1	LG1	VAZEBNÁ SKUPINA
FIGNL1 (ENSXETG00000015704)	MAST3 (ENSXETG00000012935)	DAO (ENSXETG00000022308)	NÁZEV GENU
57	112	17	SCAFFOLD
44,81 – 48,14 cM	63,55 – 65,06 cM	48-47 – 60,88 cM	PŘEDPOKLÁDANÁ POLOHA NA VAZEBNÉ MAPĚ
1 236 bp	1 619 bp	989 bp	DÉLKA SEKvence VČETNĚ PRIMERŮ
GCAGTGGCAGGAAGAAGAAC	CAGCACCTGCAGTCTGGATA	ATTGGAGCAGGAGTGATTGG	F (FORWARD) PRIMER
TTGGGGACGGTTAGTAGCAC	CAGCTCCTGTGTCTGGTTCA	GCAAGGATCTGCCCAAAGAT	R (REVERSE) PRIMER

Tabulka 5 - Seznam primerů použitých pro PCR reakci

LG5	LG4	LG4	LG3
ADAMTS18	agmat (ENSXETG00000025999)	MAT1A (ENSXETG00000003530)	STAT4 (ENSXETG00000004662)
128	1 113	75	291
73,06 cM	118,38 cM	54,28 -55,06 cM	61,23 cM; 61,95 cM
1 106 bp	963 bp	1 032 bp	1 497 bp
ATCAGCGCGAAGTTCAAAGT	GCCGGACTCACTAGCACTGT	TGTTCTTGATGCCCATTGGA	TGGAGTGGAAGCACAGACAG
ACGTGGGAGACATGATGTTG	TCCGTCGATGTCAAACTGA	TCCTCTCTGCCAAAATGACC	AGGTCCATTGGTTCATCAGC
LG5	LG5	LG4	LG4
NAIF1 (ENSXETT00000016858)	DAB2IP (ENSXETG00000000667)	MFN2 (ENSXETG00000013049)	ENSXETT00000025185
154	708	298	827
49,23 – 49,34 cM	0,00 cM	55,83cM	0,00 cM
1 340 bp	1 481 bp	1 476 bp	1 338 bp
GCTGGCTGGGCCATGGCTAC	GATGTCGGAAGTGGATCGTT	AGCCCTGGCATTGATGTAAC	CAGGCGAAAAGAAAGTCCTG
GTCTGACAACTTCATGACA	GACTGAAGTCCTCCGTGCTC	ACCGGAGAGCTCTTGTTGAA	CCAGTCCTGTTGGGACAAGT

LG7	LG7	LG6	LG5B
PSCK9 (ENSXETG00000020012)	ACP2 (ENSXETG00000003979)	EPB41 (ENSXETG00000014407)	C9orf19
1	82	492	667
40,62 – 49,66 cM	28,33 – 44,99 cM	1,92 – 18,89 cM	12,36 cM
1 315 bp	1 270 bp	1 495 bp	1 214 bp
TTTCCAGAATGTCCCAGAGG	TCACTGCTCCTAGGGTTGGT	GGATTATTGGCTGAGGCAGA	CAGGAGCTGGGAGTTTTGAG
ATTGGAAGTGC GGGAGTATG	CGTGCTGGTAACCGTTAGGT	CACTGGCATGTGCGAGTCTGT	CAGGGCACGTTTCCCTACTA
LG7	LG7	LG7	LG6
E2F4 (ENSXETG00000003083)	RASGRP2 (ENSXETG00000008447)	EXT2 (ENSXETG00000007546)	pofut1 (ENSXETG00000016634)
6	146	281	515
49,46 – 59,92 cM	56,19 – 58,84 cM	30,22 – 38,69 cM	109,69 cM
1 016 bp	1 208 bp	1 368 bp	1 053 bp
AAAGCCTTGGGCTACTCACC	AATAGTGGCGAAATGCATCC	AGCGACTTCTACACGGAGGA	TTGGCTTCTCCTTCTGCTTC
GTGATCACCAGGAGGAGGAG	GTTGGCACAACAGAGCTTGA	GGTCAGAACCATCGACACCT	CGCTTAACAAACGCAGTGAA

LG9	LG9	LG8	LG7
olig3 (ENSXETG00000022490)	CRIM1 (ENSXETG00000010373)	GEMIN5 (ENSXETG00000019404)	ZNF423 (ENSXETG00000002339)
387	206	24	288
27,39 – 27,60 cM	29,57 – 29,97 cM	48,83 – 50,99 cM	58,54 cM
1 847 bp	1 298 bp	1 227 bp	1 110 bp
Univerzální primer	AGGCTGTTATGCCAATGGAC	TCAGCACCAGCAAAGATCAC	GCAGTCGCCTTTTTAAGCAC
Univerzální primer	TGTCCCATCTCTCCTCATCC	CTTCACAGCCGTTAGGAAGC	GGATATGCTCGGTCAAGGAA
LG9	LG9	LG9	LG8
ap2m1 (ENSXETG00000017276)	TTC27 (ENSXETG00000017701)	ENSXETG00000010201	fgfr4 (ENSXETG00000007231)
132	98	372	251
11,22 – 11,63 cM	30,79 – 31,28 cM	80,07 – 82,45 cM	59,69 – 79,02 cM
1 193 bp	1 364 bp	989 bp	1 459 bp
TGTGGATGCTTTCCGTGTTA	CTGGCCGTTATTCTTGGTGT	GAAATGGAAACGTGGGTTTG	ACAGAATTGGTGGGATCCAG
CAATGTATCGCACCCATTTG	ACTTGCTTTGCTTTGGAGGA	GGGGCTGTAGGGGTAGTTCT	TCCCATGTCAACACTCCAAA



LG10	LG9
NMT1 (ENSXETG00000003237)	cde40 (ENSXETG000000021312)
155	250
1,66 – 2,34 cM	20,58 – 21,14 cM
1 306 bp	1 280 bp
GCGAAAAATGAGGAGAGAGCAC	AACATGGGGGCTCTTACATC
TTTCCATCCCCAATACCAAA	TCTGAGGTGCTCACAAAACG
LG10	LG10
EZH1 (ENSXETG000000001996)	TAF4 (ENSXETG000000001996)
29	531
1,43 – 2,92 cM	72,49 cM
1 210 bp	1 368 bp
CTACAAAGTGGCCACCCATTTC	CTCAAGCGCCCAACAACCTGTA
GTGCCCATTAGACGAGCAAT	TGAGGTCCCTGAGATTGACC

## 6.2 Syntéza cDNA značené sondy

Amplifikovanou cDNA jsem klonovala do plazmidového vektoru pJET 1.2. Dva vybrané klony jsem namnožila, izolovanou cDNA rožštěpila restriční endonukleázou BglII a zkontrolovala velikost fragmentu na agarózovém gelu. V případě pozitivního výsledku jsem cDNA z jednoho klonu kontrolovala pomocí sekvence, dále reamplifikovala a použila jako templát pro syntézu značené cDNA sondy metodou náhodných primerů. Jako značící nukleotid byl zvolen digoxigenin-11-dUTP.

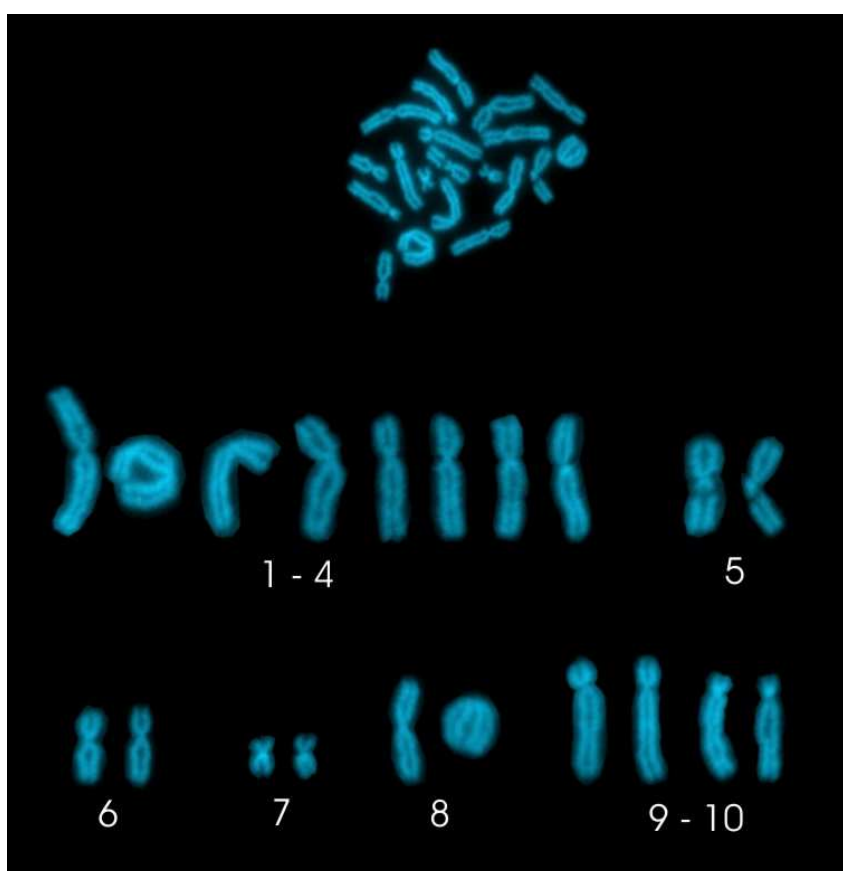
## 6.3 FISH – TSA

Vzhledem k velikosti cDNA sond, která se pohybovala v rozmezí 0,95 až 1,5 kb, jsem provedla detekci fluorescenční *in situ* hybridizací (FISH) spojenou s tyramidovou amplifikací signálu (TSA). Signál byl vizualizován aplikací anti-digoxigeninové protilátky konjugované s křenovou peroxidázou a následnou reakcí peroxidázy s tyramidem konjugovaným s tetrametylrodaminem. Metafázní chromozómy jsem značila montovacím médiem mowiol s DAPI fluorescenční barvou.

Takto značené chromozómy a specifický tetrametylrodaminový signál jednotlivých cDNA markerů jsem snímala CCD černobílou kamerou v programu DipsW 5.0. Obrázky signálů a chromozómů jsem složila a dále analyzovala v programu ACC Image Analyzer 5.0.

Výsledkem byla identifikace jednotlivých cDNA markerů. Chromozómy jsem rozlišila podle karyotypu *X. tropicalis*, založeného na poměru p a q ramene a druhotných konstrikcí (Tymowska, 1973).

**Obrázek 1** - metafázní chromozómy a karyotyp *X. tropicalis* podle Tymowska 1973. Chromozómy jsou barveny fluorescenční barvou DAPI.



V průběhu svojí práce jsem fyzicky namapovala 34 cDNA markerů do všech 10 vazebných skupin. Každý cDNA marker je charakterizován SSR markerem (či hraničními SSR markery v případě více poloh scaffoldu ve vazebné skupině), vazebnou pozicí markeru v cM v rámci LG a číslem scaffoldu (JGI 4.1), ve kterém byl identifikován. Uvedena je i velikost cDNA templátu v párech bazí (bp) pro přípravu sondy.

**Tabulka 6** – Seznam a charakterizace všech mapovaných cDNA markerů a jejich chromozomální lokalizace na základě FISH-TSA signálu.

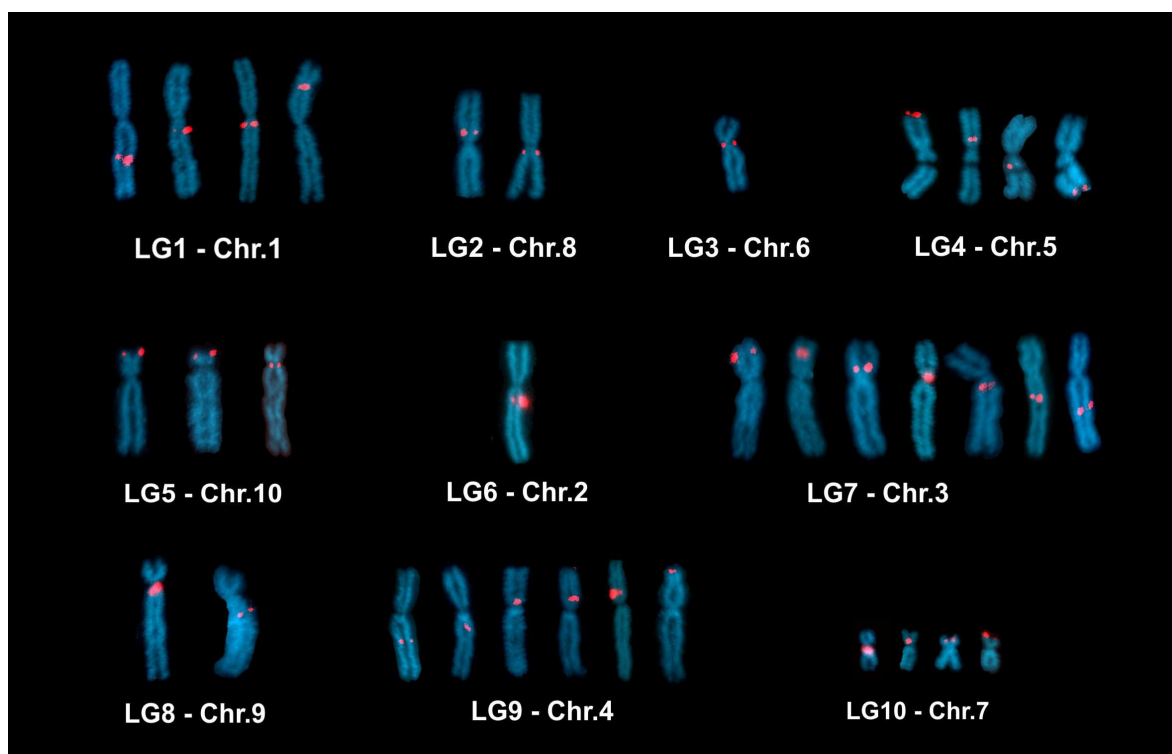
VAZEBNÁ SKUPINA	HRANIČNÍ POLOHA SCAFFOLDU (cM)	NÁZEV GENU	CHROM.	SCAFFOLD	VELIKOST cDNA TEMPLÁTU	HRANIČNÍ MARKERY
LG1	48,47	DAO	1	17	989	003D01
	60,88					003D03
	63,33	adh1b		229	1066	017B01
	63,55	MAST3		112	1619	028H06
	65,06					028D11
	79,98	EXOC1		107	1448	007C04
	83,65					023D03
LG2	44,81	FIGNL1	2	57	1236	012A06
	48,14					011D12
	49,10	FBXL7		46	923	025H10
	51,83					007H05
LG3	61,29	STAT4	6	291	1497	047B03
	61,96					074A03
LG4	0,00	ENSXETT00000025185	5	827	1338	095F08
	54,28	MAT1A		75	1032	024H11
	55,06					050E02
	55,83	MFN2		298	1476	025C12
	118,38	agmat		1113	963	085B04
LG5B	12,36	C9orf19	10	667	1214	041E03
LG5	0,00	DAB2IP		708	1481	079D08
	49,23	NAIF1		154	1390	042F11
	49,34					011D01
LG6	1,92	EPB41	2	492	1495	013D09
	18,89					013D07
LG7	30,22	EXT2	3	281	1368	045H12
	38,69					027G10
	28,33	ACP2		82	1270	030D02
	44,99					030E12
	56,19	RASGRP2		146	1208	023A08
	58,84					018F02
	58,54	ZNF423		288	1110	047F06
		ADAMTS18		128	1106	
	49,46	E2F4		6	1016	020D04
	59,92					028F09
	40,62	PCSK9		1	1315	043D06
	49,66					018G07

<b>LG8</b>	48,83	GEMIN5	<b>9</b>	24	1227	046E03
	50,99					051H02
	59,69	fgfr4		251	1469	053G06
	79,02					027A02
<b>LG9</b>	11,22	am2p1	<b>4</b>	132	1193	047C01
	11,63					023D01
	20,58	cdc40		250	1280	010G09
	21,14					010G10
	27,39	OLIG3		387	1847	003E07
	27,6					064C02
	29,57	CRIM1		206	1298	026H07
	29,97					087E03
	30,79	TTC27		98	1364	044C04
	31,28					034F03
	80,07	ENSXETG00000010201		372	989	057D07
	82,45					086H11
<b>LG10</b>	1,43	EZH1	<b>7</b>	29	1210	023G12
	2,92					049E07
	1,66	NMT1		155	1306	017H12
	2,34					018A06
	72,49	TAF4		531	1368	052G03
		pofut1		151	1053	

V průběhu mapování byl s další analýzou SSR markerů v rámci optimalizace vazebné mapy ustanoven další cluster LG5B, u něhož bylo podle LOD score testu zřejmé, že patří do vazebné skupiny LG5, bylo však třeba určit jeho přesnou polohu na chromozómu.

Při mapování jsem zjistila, že poloha některých scaffoldů ve vazebné mapě je vzhledem k fyzické poloze je zřejmě chybná. Většina scaffoldů se ve vazebné skupině vyskytuje ve více polohách, často i značně odlišných. Fyzické mapování umožnilo u těchto markerů určit, která z pozic ve vazebné mapě je správná. U genů „pofut1“ a „ADAMTS18“ jsem prokázala polohu v jiné LG, než bylo uvedeno ve vazebné mapě.

**Obrázek 2** – chromozomální pozice všech cDNA markerů mapovaných v rámci této práce pomocí FISH-TSA. Modře jsou zobrazeny metafázní chromozómy *X. tropicalis*, červeně tyramidem amplifikované signály cDNA markerů v pořadí odpovídající Tabulce 6.



#### 6.4 Měření relativné vzdálenosti signálu od centromery (RCD)

Pro každý cDNA marker jsem hodnotila pouze chromozómy vykazující specifický signál, ideálně na obou chromatidách, a to alespoň u 6 mitóz. Pozici signálu na chromozómu jsem identifikovala jako jeho relativní vzdálenost od centromery (RCD) za pomoci programu na analýzu obrazu ACC32.

Vzhledem k artefaktům, jako je např. překroucení chromozómu na preparátu, se signál na obou chromatidách může jevit v odlišné vzdálenosti od centroméry. Proto jsem vždy měřila délku ramen obou chromatid nesoucích signál a vzdálenost obou signálů od centroméry. RCD pro každý hodnocený chromozóm je aritmetickým průměrem poměrů každého z obou signálů vůči každé z obou chromatid.

Dále jsem pro každý cDNA marker z hodnot RCD každého jednotlivého měření spočítala aritmetický průměr a toto číslo představuje výslednou RCD pozici markeru na chromozómu. Pro tuto pozici jsem spočítala směrodatnou odchylku, opakovatelnost měření jsem potvrdila výpočtem konfidence (statistické věrohodnosti) na hladině  $\alpha = 0,05$ .

Hodnoty RCD jednotlivých měření, výsledná RCD s příslušnými směrodatnými odchylkami a konfidencí pro jednotlivé cDNA markery jsou shrnuty v Tabulkách 7 – 16 (vazebné skupiny LG1 – LG10). Pro přehlednost je u každého cDNA markeru uvedena i předpokládaná pozice markeru ve vazebné mapě a číslo scaffoldu.

**Tabulka 7 -** *Statistické vyhodnocení relativní vzdálenosti FISH-TSA signálu od centromery (RCD) pro LG1.*

LG1 = CHROMOZÓM 1							
NÁZEV	CM	SCAFF.	RAMENO	RCD	PRŮMĚR. RCD	SMĚR. ODCHYLKA	KONFIDENCE α=0,05
DAO	48,47 - 60,88	17	q	0,495	0,48	0,0184	0,0128
				0,48			
				0,43			
				0,49			
				0,48			
				0,485			
				0,48			
				0,49			
				0,49			
adh1b	63,33	229	q	0,245	0,22	0,0205	0,0142
				0,25			
				0,21			
				0,215			
				0,21			
				0,195			
				0,19			
				0,23			
MAST3	63,55	112	q	0,09	0,13	0,0263	0,0183
				0,12			
				0,17			
				0,12			
				0,14			
				0,15			
EXOC1	79,98 - 83,65	107	p	0,57	0,54	0,0164	0,0114
				0,52			
				0,53			
				0,53			
				0,52			
				0,52			
				0,55			
				0,55			
				0,53			

**Tabulka 8 -** Statistické vyhodnocení relativní vzdálenosti FISH-TSA signálu od centromery (RCD) pro LG2.

LG2 = CHROMOZÓM 8							
NÁZEV	CM	SCAFF.	RAMENO	RCD	PRŮMĚR. RCD	SMĚR. ODCHYLKA	KONFIDENCE $\alpha=0,05$
FIGNL1	44,81 - 48,14	57	p	0,235	<b>0,24</b>	0,0181	0,0125
				0,27			
				0,215			
				0,24			
				0,24			
				0,235			
				0,23			
				0,235			
				0,245			
				0,28			
FBXL7	49,10 - 51,83	46	q	0,135	<b>0,13</b>	0,0185	0,0128
				0,15			
				0,145			
				0,1			
				0,16			
				0,12			
				0,12			
				0,12			

**Tabulka 9 -** Statistické vyhodnocení relativní vzdálenosti FISH-TSA signálu od centromery (RCD) pro LG3.

LG3 = CHROMOZÓM 6							
NÁZEV	CM	SCAFF.	RAMENO	RCD	PRŮMĚR. RCD	SMĚR. ODCHYLKA	KONFIDENCE $\alpha=0,05$
STAT4	61,29 - 61,96	291	q	0,043	<b>0,09</b>	0,0232	0,0161
				0,115			
				0,07			
				0,11			
				0,09			
				0,08			
				0,11			
				0,06			
				0,09			

**Tabulka 10** - Statistické vyhodnocení relativní vzdálenosti FISH-TSA signálu od centroméry (RCD) pro LG4.

**LG4 = CHROMOZÓM 5**

NÁZEV	CM	SCAFF.	RAMENO	RCD	PRŮMĚR. RCD	SMĚR. ODCHYLKA	KONFIDENCE $\alpha=0,05$
<b>ENSXE TT00000 025185</b>	0,00	827	p	0,98 0,94 0,94 0,88 0,865 0,94 0,88 0,935	<b>0,92</b>	0,0375	0,0260
<b>MAT1A</b>	54,28 - 54,64	15	p	0,185 0,115 0,12 0,09 0,185 0,07 0,09 0 0,195 0,19	<b>0,12</b>	0,0613	0,0425
<b>MFN2</b>	55,83	298	q	0,15 0,15 0,125 0,145 0,14 0,17 0,1	<b>0,14</b>	0,0205	0,0142
<b>agmat</b>	118,38	1113	q	0,975 0,93 0,99 0,9 0,945 0,965 0,955 0,975	<b>0,95</b>	0,0271	0,0188



**Tabulka 11** - Statistické vyhodnocení relativní vzdálenosti FISH-TSA signálu od centroméry (RCD) pro LG5 a Cluster LG5B

**LG5 = CHROMOZÓM 10**

NÁZEV	CM	SCAFF.	RAMENO	RCD	PRŮMĚR. RCD	SMĚR. ODCHYLKA	KONFIDENCE $\alpha=0,05$
<b>C9orf19</b>	12,36 (CLUSTER LG5B)	667	p	0,92	<b>0,92</b>	0,0182	0,0119
				0,92			
				0,875			
				0,91			
				0,935			
				0,93			
				0,92			
<b>DAB2IP</b>	0,00	708	p	0,83	<b>0,83</b>	0,0061	0,0040
				0,83			
				0,83			
				0,82			
				0,835			
				0,84			
<b>NAIF1</b>	49,23 - 49,34	154	p/q	0,00	<b>0,00</b>	0,0000	0,0000
				0,00			
				0,00			
				0,00			
				0,00			
				0,00			

**Tabulka 12** - Statistické vyhodnocení relativní vzdálenosti FISH-TSA signálu od centroméry (RCD) pro LG6.

**LG6 = CHROMOZÓM 2**

NÁZEV	CM	SCAFF.	RAMENO	RCD	PRŮMĚR. RCD	SMĚR. ODCHYLKA	KONFIDENCE $\alpha=0,05$
<b>EPB41</b>	1,92 - 18,89	492	q	0,18	<b>0,22</b>	0,0236	0,0189
				0,21			
				0,2			
				0,25			
				0,21			
				0,24			

**Tabulka 13** - *Statistické vyhodnocení relativní vzdálenosti FISH-TSA signálu od centroméry (RCD) pro LG7.*

LG7 = CHROMOZÓM 3							
NÁZEV	CM	SCAFF.	RAMENO	RCD	PRŮMĚR. RCD	SMĚR. ODCHYLKA	KONFIDENCE $\alpha=0,05$
EXT2	30,22 - 38,69	281	p	0,825	<b>0,83</b>	0,0175	0,0121
				0,815			
				0,84			
				0,795			
				0,84			
				0,85			
				0,825			
				0,855			
				0,825			
ACP2	28,33 - 44,99	82	p	0,65	<b>0,68</b>	0,0207	0,0143
				0,68			
				0,72			
				0,665			
				0,69			
				0,685			
				0,69			
				0,68			
				0,65			
RASGR P2	56,19 - 58,84	146	p	0,225	<b>0,23</b>	0,0224	0,0155
				0,22			
				0,245			
				0,235			
				0,21			
				0,18			
				0,25			
				0,25			
ZNF423	58,54	288	p/q	0,00	<b>0,00</b>	0,0000	0,0000
				0,00			
				0,00			
				0,00			
				0,00			
				0,00			
ADAMT S18	(ve vazebné mapě lokalizován do LG5)	128	q	0,165	<b>0,14</b>	0,0259	0,0179
				0,15			
				0,13			
				0,09			
				0,12			
				0,16			
E2F4	49,46 - 59,92	6	q	0,32	<b>0,32</b>	0,0135	0,0094
				0,335			
				0,31			
				0,33			
				0,29			

				0,325			
				0,32			
				0,335			
				0,33			
				0,45			
				0,445			
				0,475			
				0,54			
<b>PCSK9</b>	40,62 - 49,66	1	q	0,46	<b>0,47</b>	0,0287	0,0199
				0,445			
				0,495			
				0,46			
				0,47			

**Tabulka 14** - *Statistické vyhodnocení relativní vzdálenosti FISH-TSA signálu od centroméry (RCD) pro LG8.*

**LG8 = CHROMOZÓM 9**

NÁZEV	CM	SCAFF.	RAMENO	RCD	PRŮMĚR. RCD	SMĚR. ODCHYLKA	KONFIDENCE $\alpha=0,05$
				0,00			
				0,00			
<b>GEMIN 5</b>	48,83 - 50,99	24	p/q	0,00	<b>0,00</b>	0,0000	0,0000
				0,00			
				0,00			
				0,24			
				0,255			
				0,25			
<b>fgfr4</b>	59,69 - 79,02	251	q	0,28	<b>0,26</b>	0,0252	0,0156
				0,31			
				0,22			
				0,26			
				0,25			

**Tabulka 15** - *Statistické vyhodnocení relativní vzdálenosti FISH-TSA signálu od centroméry (RCD) pro LG9.*

**LG9 = CHROMOZÓM 4**

NÁZEV	CM	SCAFF.	RAMENO	RCD	PRŮMĚR. RCD	SMĚR. ODCHYLKA	KONFIDENCE $\alpha=0,05$
<b>ap2m1</b>	11,22 – 11,63	132	q	0,445 0,465 0,48 0,495 0,5 0,46 0,48 0,45 0,44	<b>0,47</b>	0,0204	0,0141
<b>cdc40</b>	20,58 - 21,14	250	q	0,24 0,26 0,26 0,24 0,25 0,24	<b>0,25</b>	0,0090	0,0062
<b>olig3</b>	27,39 - 27,60	387	p/q	0,00 0,00 0,00 0,00 0,00 0,00	<b>0,00</b>	0,0000	0,0000
<b>CRIM1</b>	29,57 - 29,97	206	p	0,275 0,26 0,255 0,26 0,24 0,28 0,27 0,27	<b>0,26</b>	0,0119	0,0083
<b>TTC27</b>	30,79 - 31,28	98	p	0,295 0,31 0,28 0,29 0,28 0,3 0,295 0,32	<b>0,30</b>	0,0129	0,0090
<b>ENSXE TG00000 010201</b>	80,07 - 82,45	372	p	0,92 0,93 0,925 0,915 0,93 0,935 0,935 0,915	<b>0,93</b>	0,0077	0,0053

**Tabulka 16** - Statistické vyhodnocení relativní vzdálenosti FISH-TSA signálu od centroméry (RCD) pro LG10.

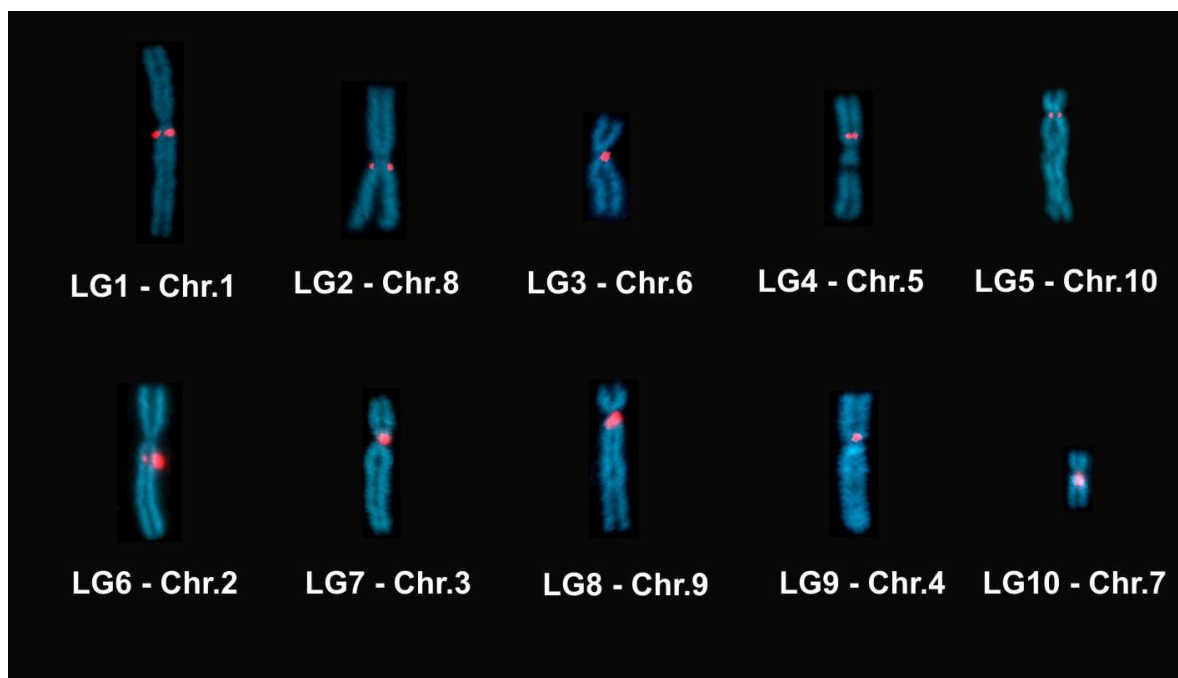
**LG10 = CHROMOZÓM 7**

NÁZEV	CM	SCAFF.	RAMENO	RCD	PRŮMĚR. RCD	SMĚR. ODCHYLKA	KONFIDENCE $\alpha=0,05$
<b>EZH1</b>	1,43 - 2,92	29	q	0,00	<b>0,03</b>	0,0631	0,0373
				0,17			
				0,00			
				0,13			
				0,00			
				0,00			
				0,00			
				0,00			
				0,00			
<b>NMT1</b>	1,66 - 2,34	155	p	0,33	<b>0,28</b>	0,0488	0,0338
				0,28			
				0,23			
				0,36			
				0,21			
				0,28			
				0,26			
<b>TAF4</b>	72,49	531	p	0,755	<b>0,75</b>	0,0629	0,0436
				0,85			
				0,63			
				0,82			
				0,71			
				0,76			
				0,75			
<b>pofut1</b>	(ve vazebné mapě lokalizován do LG6)	151	p	0,725	<b>0,94</b>	0,0537	0,0372
				0,935			
				1			
				0,83			
				0,92			
				0,96			
				1			
				0,95			

## 6.5 Identifikace centromerických markerů

Z fyzicky namapovaných marekrů jsem vybrala ty, které jsou v každé vazebné skupině nejbližší centroměře. Jejich charakterizace a průměrné RCD jsou uvedeny v Tabulce 17.

**Obrázek 3** - chromozomální pozice centromerických cDNA markerů mapovaných pomocí FISH-TSA. Modře jsou zobrazeny metafázní chromozómy *X. tropicalis*, červeně tyramidem amplifikované signály cDNA markerů.



**Tabulka 17** - Seznam a charakterizace centromerických cDNA markerů a jejich chromozomální lokalizace na základě FISH-TSA signálu.

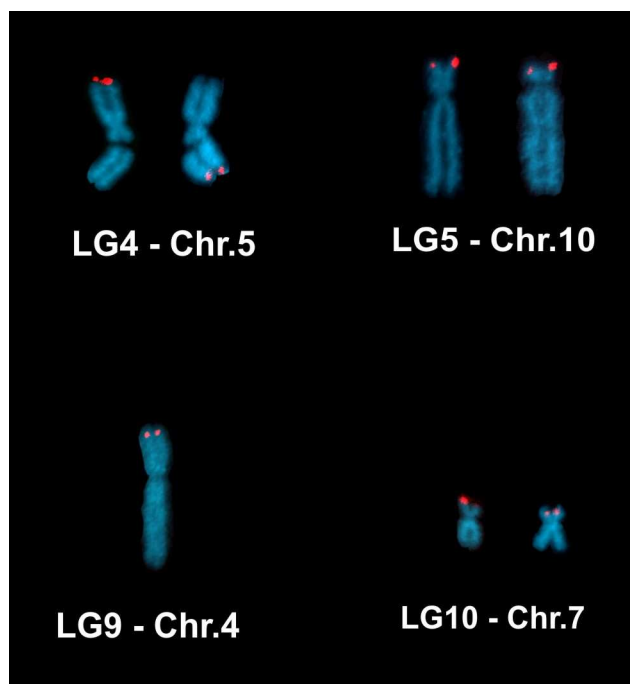
VAZEBNÁ SKUPINA	HRANIČNÍ POLOHA SCAFFOLDU (CM)	NÁZEV GENU	CHROM.	SCAFFOLD	HRANIČNÍ MARKERY	RCD
<b>LG1</b>	63,55 65,06	MAST3	<b>1</b>	112	028H06 028D11	<b>q 0,13</b>
<b>LG2</b>	49,10 51,83	FBXL7	<b>2</b>	46	025H10 007H05	<b>q 0,13</b>
<b>LG3</b>	50,90 50,99	STAT4	<b>6</b>	291	031F11 047B03	<b>q 0,09</b>
<b>LG4</b>	54,28 55,06	MAT1A	<b>5</b>	75	024H11 050E02	<b>p 0,12</b>
<b>LG5</b>	49,23 49,34	NAIF1	<b>10</b>	154	042F11 011D01	<b>p/q</b>
<b>LG6</b>	1,92 18,89	EPB41	<b>2</b>	492	013D09 013D07	<b>q 0,22</b>
<b>LG7</b>	58,54	ZNF423	<b>3</b>	288	047F06	<b>p/q</b>
<b>LG8</b>	48,83 50,99	GEMIN5	<b>9</b>	24	046E03 051H02	<b>p/q</b>

<b>LG9</b>	17,02	OLIG3	<b>4</b>	387	003E07	<b>p/q</b>
<b>LG10</b>	1,43 2,92	EZH1	<b>7</b>	29	023G12 049E07	<b>q 0,03</b>

## 6.6 Určení rozsahu vazebných skupin

V rámci určení rozsahu vazebných skupin na chromozomech jsem mapovala ty konce vazebných skupin, které ještě v laboratoři školitele nebyly mapovány dříve např. v rámci určení lokalizace clusterů.

**Obrázek 4** - chromozomální pozice terminálních cDNA markerů mapovaných v této práci pomocí FISH-TSA. Modře jsou zobrazeny metafázní chromozómy *X. tropicalis*, červeně tyramidem amplifikované signály cDNA markerů.

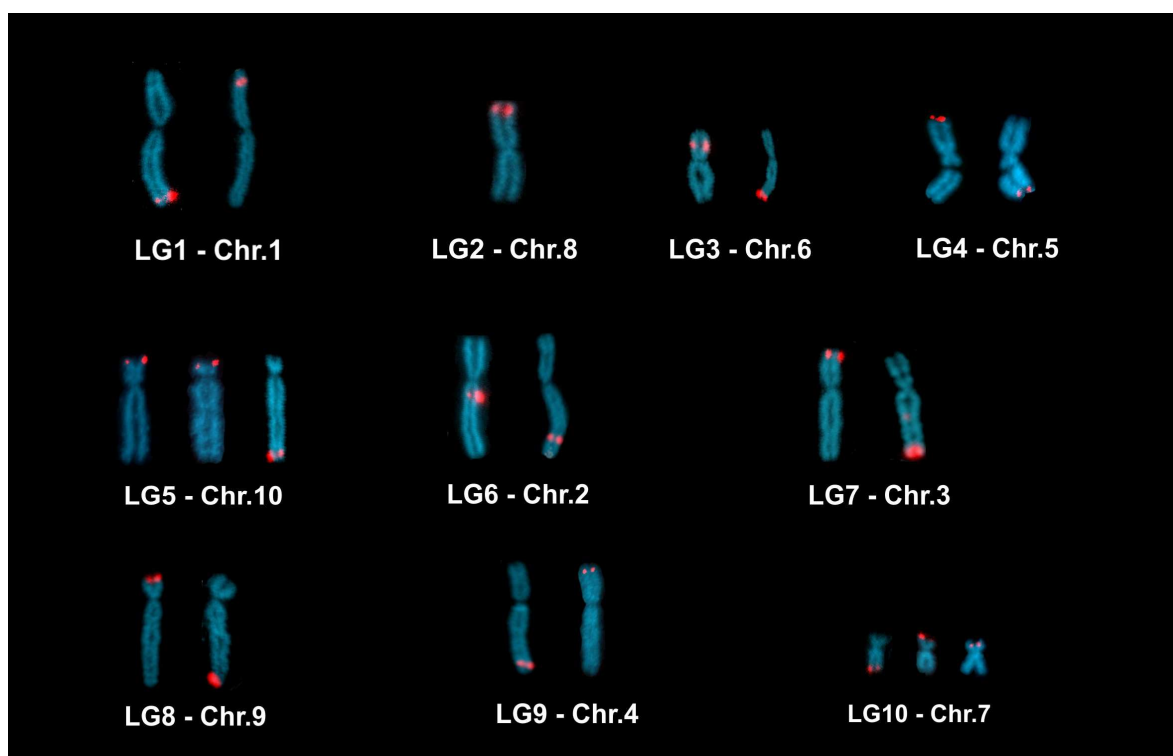


**Tabulka 18** - Seznam a charakterizace terminálních cDNA markerů, mapovaných v této práci, a jejich chromozomální lokalizace na základě FISH-TSA signálu.

VAZEBNÁ SKUPINA	HRANIČNÍ POLOHA SCAFFOLDU (cM)	NÁZEV GENU	CHROM.	SCAFFOLD	HRANIČNÍ MARKERY	RCD
<b>LG4</b>	0	ENSXETT00000025185 (hNOL1)	<b>5</b>	827	095F08	<b>p 0,92</b>
	118,38	agmat		1113	085B04	<b>q 0,95</b>
<b>LG5B</b>	12,36	C9orf19 ( <b>CLUSTER LG5B</b> )	<b>10</b>	667	041E03	<b>p 0,92</b>
<b>LG5</b>	0	DAB2IP		708	079D08	<b>p 0,83</b>
<b>LG9</b>	80,07	ENSXETG00000010201 (hBRE)	<b>4</b>	372	057D07	<b>p 0,93</b>
	82,45				086H11	
<b>LG10</b>	72,49	TAF4	<b>7</b>	531	052G03	<b>p 0,75</b>
		pofut1		151		<b>p 0,94</b>

Tyto výsledky jsem pak pro vytvoření celkového přehledu propojila s ostatními cDNA markery z konců vazebných skupin a clusterů, které již byly v laboratoři školitele mapovány dříve.

**Obrázek 5** - chromozomální pozice všech terminálních cDNA markerů, mapovaných v laboratoři školitele pomocí FISH-TSA. Modře jsou zobrazeny metafázní chromozómy *X. tropicalis*, červeně tyramidem amplifikované signály cDNA markerů.





**Tabulka 19 - Seznam a charakterizace všech terminálních cDNA markerů, mapovaných v laboratoři školitele, a jejich chromozomální lokalizace na základě FISH-TSA signálu.**

VAZEBNÁ SKUPINA	HRANIČNÍ POLOHA SCAFFOLDU (cM)	NÁZEV GENU	CHROM.	SCAFFOLD	HRANIČNÍ MARKERY	RCD
LG1	20,14	PIAS2	1	217	046G12	q 0,95
	21,48				042H05	
	96,28	WHSC2		237	007G04	p 0,78
LG2	15,05	AXUD1	8	28	005G10	p 0,85
	28,86				001F12	
LG3	40,01	7671	6	27	008D02	p 0,58
	43,65				017D02	
	11,9	SMARCA1 (CLUSTER D)		893	039G10	q 1,00
LG4	0,00	ENSXETT00000025185	5	827	095F08	p 0,92
	118,38	agmat		1113	085B04	q 0,95
LG5B	12,36	C9orf19	10	667	041E03	p 0,92
LG5	0,00	DAB2IP		708	079D08	p 0,83
	15,05	UBQLN4 (CLUSTER E)		427	015D01	q 0,93
	15,50				015C11	
LG6	1,92	EPB41	2	492	013D09	q 0,22
	18,89				013D07	
	47,32	PAN3		80	027G08	q 0,76
	49,65				017E04	
LG7	2,00	SOX6	3	1001	032A03	p 0,96
	15,58	PTPRG (CLUSTER C)		126	049G10	q 0,96
	22,61				034A11	
LG8	17,49	K1718	9	809	038B06	p 1,00
	6,03	CHD3 (CLUSTER F)		675	045C01	q 1,00
LG9	0,00	TRAM2 (CLUSTER A)	4	63	043G07	q 0,88
	5,40				046D07	
	80,07	ENSXETG00000010201		372	057D07	p 0,93
	82,45				086H11	
LG10		pofut1	7	151		p 0,94
	72,49	TAF4		531	052G03	p 0,75
	8,18	MAP2K4 (CLUSTER B)		178	045B08	q 1,00
	11,30				033F12	

## 7. DISKUZE

Ucelená vazebná mapa a znalost sekvence celého genomu patří mezi základní prostředky k charakterizaci genomu modelového organismu a slouží jako výchozí body pro podrobnější genomické výzkumy, zahrnující funkci vývojově významných genů a jejich lokalizaci na chromozómu, buněčnou signalizaci a mechanismy diferenciaci a proliferace buněk. Ve spolupráci s laboratoří oddělení biologie a biochemie v University of Houston, Texas, vznikla provizorní vazebná mapa *X. tropicalis*, založená na analýze SSR polymorfních markerů. Tato mapa je v současné době zdokonalována jak dalšími analýzami SSR markerů, tak fyzickým mapováním pomocí metody FISH-TSA.

Výhoda fluorescenčního *in situ* mapování je především v tom, že umožní zjistit pokrytí chromozómu vazebnou skupinou, její orientaci na chromozómu a v neposlední řadě lokalizaci jinak nezařaditelných clusterů. Přesnost vazebné mapy stoupá s počtem sledovaných potomků polymorfních rodičů. Vzhledem k tomu, že vazebná mapa *X. tropicalis* byla vytvořena na základě sledování zhruba 500 jedinců, lze očekávat drobné chyby, které je třeba odhalit a korigovat. Analyzovat vysoké počty potomků lze poměrně snadno, pokud jsou sledovány fenotypové markery, jako bylo běžnou praxí u *Drosophily* (Tanksley a Rick, 1980). V případě mapování DNA markerů však představují vyšší počty jedinců neúměrnou časovou a finanční zátěž. U fyzického mapování odpadá problém nutnosti vysokého počtu sledovaných jedinců, je pouze nutné pracovat s tkáňovou kulturou, poskytující dělicí se buňky. Význam fyzického mapování pro další upřesnění poloh jednotlivých vazebných markerů je proto značný.

### 7.1 Orientace a rozsah všech vazebných skupin

V rámci této práce byla potvrzena orientace vazebných skupin LG1 – LG9, v případě LG10 byla prokázána opačná orientace, než se předpokládalo na základě dosavadních výsledků.

**Tabulka 20** - orientace vazebných skupin. Barevně jsou vyznačeny ty vazebné skupiny, které mají opačnou orientaci.

VAZEBNÁ SKUPINA	LG 1	LG 2	LG 3	LG 4	LG 5	LG 6	LG 7	LG 8	LG 9	LG 10
ORIENTACE	q - p	p - q	p - q	p - q	p - q	p - q	p - q	p - q	q - p	q - p

Mapování koncových markerů v laboratoři školitele ukázalo, že po celé délce jsou vazebnou mapou pokryty tyto chromozómy:

- Chromozóm 1 – LG1
- Chromozóm 3 – LG7 a cluster C
- Chromozóm 4 – LG9 a cluster A
- Chromozóm 5 – LG4
- Chromozóm 6 – LG3 a cluster D
- Chromozóm 7 – LG10 a cluster B
- Chromozóm 9 – LG8 a cluster F
- Chromozóm 10 – LG5 a cluster B, cluster LG5B

Nově vzniklý cluster LG5B byl fyzickým mapováním lokalizován na konec p ramene chromozómu 10, tedy před začátek samotné LG5.

U chromozómu č. 2 (LG6) začíná vazebná skupina na poloze q 0,22, což znamená, že celé krátké rameno, centromera a část dlouhého ramene jsou vazebnou mapou nepokryté. Tato skutečnost by mohla souviset s typem určení pohlaví u *X. tropicalis*, který je zatím nejasný. Naznačují tomu i úseky syntenní s lidským chromozómem X. Dalším kandidátním chromozómem je č. 10 (LG5) pro svoji vysokou synténii s lidským chromozómem X. Studie provedené na příbuzném druhu *Xenopus laevis* jasně ukazují, že má tento druh heterogametické samičí pohlaví (typ určení pohlaví Abraxas) (Chang et al, 1955), výzkumy udělané na druhu *X. tropicalis* se zatím v různých laboratořích liší.

Chromozóm č. 8 nebyl zatím jako jediný fyzicky zmapován celý. Zatím je pouze prokázáno, že vazebná skupina začíná na konci krátkého ramene a její polovina je zhruba v oblasti centromery. LG2 je v současné době znovu analyzována z hlediska SSR markerů a laboratoř školitele zatím ze spolupracující laboratoře University of Houston ne získala výsledky.

## 7.2 Gen-centromerické mapování

Jedním z cílů této práce bylo také nalézt markery co nejbližší centromerickým pozicím. Důvodem jsou možnosti lokalizace recesivních mutací do jednotlivých vazebných skupin a chromozómů, které nabízí gynogenetické křížení, je-li známá poloha polymorfních centromerických markerů.

Při křížení samce s recesivní mutací, která má viditelný fenotypový projev, a samice bez mutace by v ideálním případě, kdy by neprobíhala rekombinace, bylo v první filiální generaci 50% jedinců s fenotypovým projevem mutace a 50% jedinců bez mutace. Tomuto ideálnímu stavu téměř či úplně odpovídá centromerická pozice genu, kdy rekombinace probíhá v minimálním počtu případů. Čím dále je poloha sledovaného genu od centromery, s tím vyšší frekvencí bude docházet k rekombinaci. Výsledkem je vyšší počet jedinců bez mutace v porovnání s mutovanými – heterozygotní jedinci sice nesou mutaci v jedné alele, mutace se ale u nich fenotypově neprojevuje. Z tohoto poměru lze vypočítat přibližnou vzdálenost sledovaného genu od centromery (Zimmermann, ústní sdělení).

Předchozím postupem tedy získáme 20 možných pozic sledovaného genu – 20 proto, že známe vzdálenost od centromery, ale nevíme, zda gen leží na krátkém nebo na dlouhém rameni chromozómu a také nevíme, o který chromozóm se jedná. Dále tedy stačí vazebně analyzovat pouze 20 polymorfních markerů. Polymorfismus na jednom z 10 chromozómů *X. tropicalis* se pravděpodobně ukáže spojený s mutantním fenotypem odhaleným při gynogenetickém křížení, dalších 9 centromer se ve většině případů projeví jako nepravděpodobné.

Tento vztah lze použít u analýz recesivních mutací právě jen pomocí gynogenetického křížení, což značně zjednoduší lokalizace hledaných mutací v porovnání s tradičními protokoly. Lze tak v kratším čase a s menšími náklady studovat nejen geny relevantní pro oogenetický vývoj a určení tělního plánu, ale jakékoliv geny, jejichž recesivní mutace má zjištělný fenotypový projev.

Technika gen-centromerického mapování byla již v 90. letech použita u druhu danio pruhované (*Danio rerio*) kolektivem Streisinger et al a u druhu pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*, *Salmo gairdneri*) kolektivem Allendorf et al. V první studii autoři analyzovali polohu 4 genů, jejichž mutace ovlivňují pigmentové zbarvení dania pruhovaného (Streisinger et al, 1986), druhá studie se zabývá lokalizující genů 25 enzymů

u pstruha pruhovaného (Allendorf et al, 1986). V pozdějších letech vznikaly další práce založené na této metodě, například na modelu sumecků *Ictalurus furcatus* a *I. punctatus* (Liu et al, 1992) i na modelu medaka *Oryzias latipes* a *O. luzonensis* (Sato et al, 2001).

U všech vazebných skupin se v této práci podařilo mapovat marker v centromere nebo v její blízkosti s výjimkou LG6, kde vazebná skupina začíná na pozici q 0,22. Mapování markerů přesně do centromery ztěžovalo omezené množství SSR markerů se známým scaffoldem, v některých scaffoldech také nebylo možné najít dostatečně dlouhý gen s vhodnou expresí, ze kterého by bylo možné vytvořit cDNA značenou sondu.

Přibližné namapování však stačí pro potvrzení lokalizací centromerických markerů podle gynogenetického křížení, které proběhlo ve spolupracující laboratoři National Institute for Medical Research v Londýně, UK. Bylo tak prokázáno, že gynogenetické křížení, založené na poměru počtu homozygótních a heterozygótních potomků, je spolehlivým a přesným nástrojem studia genomu organizmů.

Výsledky této práce byly ve spolupráci s laboratoří oddělení biologie a biochemie v University of Houston, Texas, a laboratoří National Institute for Medical Research v Londýně, UK, prezentovány na 12. mezinárodní *Xenopus* konferenci v Německu v září 2008 formou posteru s názvem „Mapping *X. tropicalis* Mutations with Gynogenesis and Centromeres“. Dále byl na základě popsanych dat uveřejněn článek s názvem „Rapid Gynogenetic Mapping of *Xenopus tropicalis* Mutations to Chromosomes“, který je v době odevzdání této práce s tisku časopisu *Developmental Dynamics* (Khoka et al, in press).

## 8. ZÁVĚR

1. Na základě stávající vazebné mapy *X. tropicalis* (<http://tropmap.biology.uh.edu/>) jsem ve scaffoldech, odpovídajících vybraným SSR markerům, identifikovala známé geny.
2. S využitím klonované cDNA sekvence zvolených genů jsem metodou náhodných primerů připravila Dig-11-dUTP značené sondy.
3. Pomocí metody FISH – TSA jsem značené cDNA sondy fyzicky namapovala a jejich polohy statisticky vyhodnotila včetně směrodatné odchylky a konfidence na hladině  $\alpha = 0,05$ .
4. Identifikovala jsem centromerické polymorfní markery u všech vazebných skupin a potvrdila tak výsledky gynogenetického křížení laboratoře National Institute for Medical Research v Londýně.
5. S využitím cDNA markerů již namapovaných v laboratoři školitele a cDNA markerů mapovaných v této práci jsem určila pokrytí chromozómů vazebnými skupinami a jejich terminální polohy.
6. Výsledky této práce byly prezentovány na 12. mezinárodní *Xenopus* konferenci formou posteru a v článku „Rapid Gynogenetic Mapping of *Xenopus tropicalis* Mutations to Chromosomes”, který je nyní v tisku časopisu *Developmental Dynamics*.

## CITOVANÁ LITERATURA

1. Abecasis GR, Cookson WO (2000): GOLD--graphical overview of linkage disequilibrium. *Bioinformatics*. Feb; 16(2):182-3.
2. Allendorf FW, Seeb JE, Knudsen KL, Thorgaard GH, Leary RF (1986): Gene-centromere mapping of 25 loci in rainbow trout. *The Journal of Heredity*: 77(5):307-312
3. Amaya E (2005): Xenomics. *Genome Res*. Dec; 15(12):1683-91.
4. Amaya E, Offield MF, Grainger RM (1998): Frog genetics: *Xenopus tropicalis* jumps into the future. *Trends Genet*. Jul; 14(7):253-5.
5. Bellerby CW (1934.): A rapid test for the diagnosis of pregnancy. *Nature*. 133: 494–495.
6. Bobrow MN, Harris TD, Shaughnessy KJ, Litt GJ (1989): Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *J Immunol Methods*. Dec 20; 125(1-2):279-85.
7. Bloch B (1993): Biotinylated probes for *in situ* hybridization histochemistry: use for mRNA detection. *J Histochem Cytochem*. Dec; 41(12):1751-4.
8. Bolker JA (2005): Model systems in developmental biology. *BioEssays*. Feb; 17(5): 451 – 455.
9. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*. 1980 May;32(3):314-31.
10. Bradley S, Zamechek L, Aurich-Kosta J (2008): Oligonucleotide FISH probes. *Fluorescence In situ Hybridization (FISH) - Application Guide*, Springer Berlin Heidelberg
11. Broman KW, Rowe LB, Churchill GA, Paigen K (2002): Crossover interference in the mouse. *Genetics*. Mar;160(3):1123-31.
12. Buetow KH (2001): Construction of reference genetic maps. *Curr Protoc Hum Genet*. May; Chapter 1:Unit 1.5.
13. Cannatella D.C., de Sa R.O. (1993): *Xenopus laevis* as a model organism. *Syst. Biol*. 42:476-507.
14. Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, Shaw N, Lane CR, Lim EP, Kalyanaraman N, Nemesh J, Ziaugra L, Friedland L, Rolfe A, Warrington J, Lipshutz R, Daley GQ, Lander ES (1999): Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet*. Jul; 22(3):231-8.

15. Carlson B (2008): SNPs – A Shortcut to Personalized Medicine. Genetic Engineering & Biotechnology News: p. 12.
16. Casey J, Davidson N (1977): Rates of formation and thermal stabilities of RNA:DNA and DNA:DNA duplexes at high concentrations of formamide. Nucleic Acids Res.; 4(5):1539-52.
17. Chang CY, Witschi E. (1955): Breeding of sex-reversed males of *Xenopus laevis* Daudin. Proc Soc Exp Biol Med. May; 89(1):150-2.
18. Chourrout D (1982): Gynogenesis in vertebrates. Reprod Nutr Dev; 22(5):713-34.
19. de Boer E, Dietrich AJ, Höög C, Stam P, Heyting C (2007): Meiotic interference among MLH1 foci requires neither an intact axial element structure nor full synapsis. J Cell Sci. Mar 1;120(Pt 5):731-6.
20. de Sá RO, Hillis DM: Phylogenetic relationships of the pipid frogs *Xenopus* and *Silurana*: an integration of ribosomal DNA and morphology. Mol Biol Evol. 1990 Jul;7(4):365-76.
21. Devlin B, Risch N (1995): A comparison of linkage disequilibrium measures for fine-scale mapping. Genomics. Sep 20; 29(2):311-22.
22. Erpelding JE, Blake NK, Blake TK, Talbert LE (1996): Transfer of sequence tagged site PCR markers between wheat and barley. Genome. Aug; 39(4):802-10.
23. Gall JG, Pardue ML (1969): Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. Proc Natl Acad Sci U S A. Jun; 63(2):378-83.
24. Goda T, Abu-Daya A, Carruthers S, Clark MD, Stemple DL, Zimmerman LB (2006): Genetic screens for mutations affecting development of *Xenopus tropicalis*. PLoS Genet. Jun; 2(6):e91. Epub 2006 Jun 9.
25. Goldstein DB, Ruiz Linares A, Cavalli-Sforza LL, Feldman MW (1995): An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. Genetics. Jan; 139(1):463-71.
26. Gosden J, Hanratty D, Starling J, Fantes J, Mitchell A, Porteous D (1991): Oligonucleotide-primed *in situ* DNA synthesis (PRINS): a method for chromosome mapping, banding, and investigation of sequence organization. Cytogenet Cell Genet. 1991; 57(2-3):100-4.
27. Graf JD. (1989): Genetic mapping in *Xenopus laevis*: eight linkage groups established. Genetics. Oct;123(2):389-98.
28. Graf JD, Kobel HR. (1991): Genetics of *Xenopus laevis*. Methods Cell Biol. 36:19-34.
29. Green ED, Green P. (1991): Sequence-tagged site (STS) content mapping of human chromosomes: theoretical considerations and early experiences. PCR Methods Appl. Nov;1(2):77-90.



30. Gyapay G, Schmitt K, Fizames C, Jones H, Vega-Czarny N, Spillett D, Muselet D, Prud'Homme JF, Dib C, Auffray C, Morissette J, Weissenbach J, Goodfellow PN (1995): A radiation hybrid map of the human genome. *Human Mol Genetics* March; 5(2): 339-346.
31. Henderson SA (1970): The time and place of meiotic crossing-over. *Annu Rev Genet.*; 4:295-324.
32. Hirsch N, Zimmerman LB, Grainger RM. (2002): *Xenopus*, the next generation: *X. tropicalis* genetics and genomics. *Dev Dyn.* Dec; 225(4):422-33.
33. Hudson TJ, Church DM, Greenaway S, Nguyen H, Cook A, Steen RG, Van Etten WJ, Castle AB, Strivens MA, Trickett P, Heuston C, Davison C, Southwell A, Hardisty R, Varela-Carver A, Haynes AR, Rodriguez-Tome P, Doi H, Ko MS, Pontius J, Schriml L, Wagner L, Maglott D, Brown SD, Lander ES, Schuler G, Denny P (2001): A radiation hybrid map of mouse genes. *Nat Genet.* Oct; 29(2):201-5.
34. Harrer T, Schwinger E, Mennicke K (2001): A new technique for cyclic *in situ* amplification and a case report about amplification of a single copy gene sequence in human metaphase chromosomes through PCR-PRINS. *Hum Mutat.* Feb; 17(2):131-40.
35. Hykelová (2003): Genetické mapování jako nástroj ke studiu evoluce pohlavních chromozómů rodu *Silene*. *Biol. Listy* 68(3); 183-189.
36. Jackson SA, Cheng Z, Wang ML, Goodman HM, Jiang J (2000): Comparative fluorescence *in situ* hybridization mapping of a 431-kb *Arabidopsis thaliana* bacterial artificial chromosome contig reveals the role of chromosomal duplications in the expansion of the *Brassica rapa* genome. *Genetics.* Oct; 156(2):833-8.
37. Jia X, Zhang Z, Liu Y, Zhang C, Shi Y, Song Y, Wang T, Li Y (2009): Development and genetic mapping of SSR markers in foxtail millet [*Setaria italica* (L.) P. Beauv.]. *Theor Appl Genet.* Feb; 118(4):821-9.
38. Jiang J, Gill BS (2006): Current status and the future of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome.* Sep; 49 (9):1057-68.
39. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL (1985): Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature.* Mar 7-13; 314(6006):67-73.
40. Johnson SL, Africa D, Horne S, Postlethwait JH (1995): Half-tetrad analysis in zebrafish: mapping the *ros* mutation and the centromere of linkage group I. *Genetics.* Apr; 139(4):1727-35.
41. Johnson SL, Gates MA, Johnson M, Talbot WS, Horne S, Baik K, Rude S, Wong JR, Postlethwait JH. (1996): Centromere-linkage analysis and consolidation of the zebrafish genetic map. *Genetics.* Apr;142(4):1277-88.

42. Keim P, Price LB, Klevytska AM, Smith KL, Schupp JM, Okinaka R, Jackson PJ, Hugh-Jones ME (2000): Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol.* May; 182(10):2928-36.
43. Khokha MK, Chung C, Bustamante EL, Gaw LW, Trott KA, Yeh J, Lim N, Lin JC, Taverner N, Amaya E, Papalopulu N, Smith JC, Zorn AM, Harland RM, Grammer TC. (2002): Techniques and probes for the study of *Xenopus tropicalis* development. *Dev Dyn.* Dec; 225(4): 499-510.
44. Khokha MK, Krylov V, Reilly MJ, Gall JG, Bhattacharya D, Cheung CYJ, Kaufman S, Lam DK, Macha J, Ngo C, Prakash N, Schmidt P, Tlapakova T, Trivedi T, Tumova L, Abu-Daya A, Geach T, Vendrell E, Ironfield H, Sinzelle L, Sater AK, Wells DE, Harland RM, Zimmerman LB: Rapid Gynogenetic mapping of *Xenopus tropicalis* mutations to chromosomes. *Dev Dyn.*, in press.
45. Klein SL, Strausberg RL, Wagner L, Pontius J, Clifton SW, Richardson P. (2002): Genetic and genomic tools for *Xenopus* research: The NIH *Xenopus* initiative. *Dev Dyn.* Dec;225(4):384-91.
46. Knoll A, Stratil A, Vykoukalová Z, Van Poucke M, Bartenschlager H, Peelman LJ, Geldermann H (2003): Polymorphism analysis and mapping to SSC4 of the porcine apolipoprotein A2 (APOA2) gene. *Anim Genet.* Oct;34(5):384-6.
47. Koch JE, Kølvrå S, Petersen KB, Gregersen N, Bolund L (1989): Oligonucleotide-priming methods for the chromosome-specific labelling of alpha satellite DNA *in situ*. *Chromosoma.* Oct; 98(4):259-65.
48. Kochan KJ, Wright DA, Schroeder LJ, Shen J, Morizot DC (2003): Genetic linkage maps of the West African clawed frog *Xenopus tropicalis*. *Dev Dyn.* Jan;226(1):99-102.
49. Krejčí K, Koch J (1999): An *in situ* study of variant telomeric repeats in human chromosomes. *Genomics.* Jun 1; 58(2):202-6.
50. Krotoski DM, Reinschmidt DC, Tompkins R (1985): Developmental mutants isolated from wild-caught *Xenopus laevis* by gynogenesis and inbreeding. *J Exp Zool.* Mar; 233(3):443-9.
51. Krylov V, Tlapakova T, Macha J (2007): Localization of the single copy gene *Mdh2* on *Xenopus tropicalis* chromosomes by FISH-TSA. *Cytogenet Genome Res.*; 116(1-2):110-2.
52. Kubaláková M, Macas J, Doležal J (1997): Mapping of repeated DNA sequences in plant chromosomes by PRINS and C-PRINS. *Theor. Appl. Genet.* 94: 758.
53. Kuhl SJ, Tang YJ, Navarro L, Gumerlock PH, Silva J Jr. (1993): Diagnosis and monitoring of *Clostridium difficile* infections with the polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis.* Jun; 16 Suppl 4:S234-8.

54. Lee HR, Bae IH, Park SW, Kim HJ, Min WK, Han JH, Kim KT, Kim BD (2009): Construction of an integrated pepper map using RFLP, SSR, CAPS, AFLP, WRKY, rRAMP, and BAC end sequences. *Mol Cells*. Feb 28; 27(1):21-37.
55. Lewontin RC and Kojima K (1960): The evolutionary dynamics of complex polymorphisms. *Evolution* 14 (4): 458–472.
56. Liu Q, Goudie CA, Simco BA, Davis KB, Morizot DC (1992): Gene-Centromere Mapping of Six Enzyme Loci in Gynogenetic Channel Catfish. *The Journal of Heredity*: 83(4):245-248.
57. Luo ZW, Hackett CA, Bradshaw JE, McNicol JW, Milbourne D (2001): Construction of a genetic linkage map in tetraploid species using molecular markers. *Genetics*. Mar; 157(3):1369-85.
58. Mácha J, Tlapáková T, Krylov V, Kopský V (2003): Xstir polymorphism and absence of sex linkage in *Xenopus laevis* ME2 gene. *Folia Biol (Praha)*; 49(3):115-7.
59. Marra MA, Hillier L, Waterston RH (1998): Expressed sequence tags-ESTablishing bridges between genomes. *Trends Genet*. Jan; 14(1):4-7.
60. McCarthy LC (1996): Whole genome radiation hybrid mapping. *Trends Genet*. Dec; 12(12):491-3.
61. Meudt HM, Clarke AC (2007): Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends Plant Sci*. Mar; 12(3):106-17.
62. Molenaar C, Marras SA, Slats JC, Truffert JC, Lemaître M, Raap AK, Dirks RW, Tanke HJ (2001): Linear 2' O-Methyl RNA probes for the visualization of RNA in living cells. *Nucleic Acids Res*. Sep 1; 29(17):E89-9.
63. Morton NE (1955): Sequential tests for the detection of linkage. *Am. J. Hum. Genet* 7: 277-318.
64. Mueller UG, Wolfenbarger LL (1999): AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol Evol*. Oct; 14(10):389-394.
65. Nakamura Y, Leppert M, O'Connell P, Wolff R, Holm T, Culver M, Martin C, Fujimoto E, Hoff M, Kumlin E, et al (1987): Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science*. Mar 27; 235(4796):1616-22.
66. Nath J, Johnson KL (1998): Fluorescence *in situ* hybridization (FISH): DNA probe production and hybridization criteria. *Biotech Histochem*. Jan; 73(1):6-22.
67. Noramly S, Zimmerman L, Cox A, Aloise R, Fisher M, Grainger RM. (2004): A gynogenetic screen to isolate naturally occurring recessive mutations in *Xenopus tropicalis*. *Mech Dev*. Mar; 122(3):273-87.
68. Olson MV, Dutchik JE, Graham MY, Brodeur GM, Helms C, Frank M, MacCollin M, Scheinman R, Frank T (1986): Random-clone strategy for genomic restriction mapping in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct; 83(20):7826-30.

69. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K (1989): Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*. Nov; 5(4):874-9.
70. Pernthaler A, Pernthaler J, Amann R (2002): Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl Environ Microbiol*. Jun; 68(6):3094-101.
71. Pfaffelhuber P, Lehnert A, Stephan W (2008): Linkage disequilibrium under genetic hitchhiking in finite populations. *Genetics*. May; 179(1):527-37.
72. Pollet N, Mazabraud A. (2006): Insights from *Xenopus* genomes. *Genome Dyn.*;2:138-53.
73. Qu J, Dallaire L, Lemieux N, Drouin R, Richer CL (1989): Synchronization of amniotic fluid cells for high resolution cytogenetics. *Prenatal Diagnostic* 9(1) 49-56.
74. Queller DC, Strassman JE, Hughes CR (1993) :Microsatellites and Kinship. *Trends in Ecology and Evolution* 8: 285 – 288.
75. Rapley R, Harbron S (2004): *Molecular Analysis and Genome Discovery*. Chichester. John Wiley & Sons Ltd.
76. Reiter RS, Williams JG, Feldmann KA, Rafalski JA, Tingey SV, Scolnik PA (1992): Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*. Feb 15;89(4):1477-81.
77. Reinschmidt D, Friedman J, Hauth J, Ratner E, Cohen M, Miller M, Krotoski D, Tompkins R. (1985): Gene-centromere mapping in *Xenopus laevis*. *J Hered*. Sep-Oct; 76(5):345-7.
78. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. Dec 20;230(4732):1350-4.
79. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. Jan 29; 239(4839):487-91.
80. Sato T, Yokomizo S, Matsuda M, Hamaguchi S, Sakaizumi M (2001): Gene-centromere mapping of medaka sex chromosomes using triploid hybrids between *Oryzias latipes* and *O. luzonensis*. *Genetica.*; 111(1-3):71-5.
81. Schriml LM, Padilla-Nash HM, Coleman A, Moen P, Nash WG, Menninger J, Jones G, Ried T, Dean M (1999): Tyramide signal amplification (TSA)-FISH applied to mapping PCR-labeled probes less than 1 kb in size. *Biotechniques*. Sep; 27(3):608-13.

82. Sibony M, Commo F, Callard P, Gasc JM (1995): Enhancement of mRNA *in situ* hybridization signal by microwave heating. Lab Invest. Oct; 73(4):586-91.
83. Sieben VJ, Debes Marun CS, Pilarski PM, Kaigala GV, Pilarski LM, Backhouse CJ (2007): FISH and chips: chromosomal analysis on microfluidic platforms. IET Nanobiotechnol. Jun; 1(3):27-35.
84. Singer A, Perlman H, Yan Y, Walker C, Corley-Smith G, Brandhorst B, Postlethwait J (2002): Sex-specific recombination rates in zebrafish (*Danio rerio*). Genetics. 2002 Feb;160(2):649-57.
85. Southern EM. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol. Nov 5;98(3):503-17.
86. Speel EJ, Hopman AH, Komminoth P (1999): Amplification methods to increase the sensitivity of *in situ* hybridization: play card(s). J Histochem Cytochem. Mar; 47(3):281-8.
87. Sperry A, Jin L, Lloyd RV (1996): Microwave treatment enhances detection of RNA and DNA by *in situ* hybridization. Diagn Mol Pathol. Dec; 5(4):291-6.
88. Staden R (1980): A new computer method for the storage and manipulation of DNA gel reading data. Nucleic Acids Res. Aug 25; 8(16):3673-94.
89. Streisinger G, Singer F, Walker C, Knauber D, Dower N (1986): Segregation analyses and gene-centromere distances in zebrafish. Genetics. Feb;112(2):311-9.
90. Tamaki K, Monckton DG, MacLeod A, Neil DL, Allen M, Jeffreys AJ (1992): Minisatellite variant repeat (MVR) mapping: analysis of 'null' repeat units at D1S8. Hum Mol Genet. 1992 Sep;1(6):401-6. Erratum in: Hum Mol Genet 1 Oct; 1(7):558.
91. Tanksley SD, Rick M (1980): Isozymic gene linkage map of the tomato: Applications in genetics and breeding. Theor Appl Genet. Mar; 58(2):161-70.
92. Tautz D, Renz M (1984): Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. Nucleic Acids Res. May 25; 12(10):4127-38.
93. Thiébaud CH, Colombelli B, Müller WP (1984): Diploid gynogenesis in *Xenopus laevis* and the localization with respect to the centromere of the gene for periodic albinism ap. J Embryol Exp Morphol. 1984 Oct;83:33-42.
94. Thymowska J. (1973): Karyotype analysis of *Xenopus tropicalis* gray, Pipidae. Gynogenet. Cell genet. 12: 297-304.
95. Tlapakova T, Krylov V, Macha J (2005): Localization, structure and polymorphism of two paralogous *Xenopus laevis* mitochondrial malate dehydrogenase genes. Chromosome Res.; 13(7):699-706.
96. Tompkins R, Reinschmidt D (1991): Experimentally induced homozygosity in *Xenopus laevis*. Methods Cell Biol.; 36:35-44.

97. Tompsett AR, Park JW, Zhang X, Jones PD, Newsted JL, Au DW, Chen EX, Yu R, Wu RS, Kong RY, Giesy JP, Hecker M (2009): *In situ* hybridization to detect spatial gene expression in medaka. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2009 Jan 13.
98. Trask BJ (1991): Fluorescence *in situ* hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. *Trends Genet.* May; 7(5):149-54.
99. Van Heusden J, de Jong P, Ramaekers F, Bruwier H, Borgers M, Smets G (1997): Fluorescein-labeled tyramide strongly enhances the detection of low bromodeoxyuridine incorporation levels. *J Histochem Cytochem.* Feb; 45(2):315-9.
100. Varshney RK, Bertoli DJ, Moretzsohn MC, Vadez V, Krishnamurthy L, Aruna R, Nigam SN, Moss BJ, Seetha K, Ravi K, He G, Knapp SJ, Hoisington DA (2009): The first SSR-based genetic linkage map for cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Theor Appl Genet.* Feb; 118(4):729-39.
101. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, et al (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* Nov 11;23(21):4407-14.
102. Wagner M, Horn M, Daims H (2003): Fluorescence *in situ* hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. *Curr Opin Microbiol.* Jun; 6(3):302-9.
103. Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. (1990) : DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* Nov 25; 18(22):6531-5.
104. Yang XQ, Zhao Q, Fu TH (2008): Ordered tetrad analysis of two genes in *Neurospora*. *Yi Chuan.* Jun; 30(6):801-6.
105. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
106. <http://en.wikipedia.org/>
107. <http://faculty.virginia.edu/xtropicalis/GenomeBACintro.htm>
108. <http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/runAlignment?db=Xentr4>
109. <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>
110. <http://tropicalis.berkeley.edu/home/>
111. <http://tropmap.biology.uh.edu>
112. <http://www.biochemweb.org/development.shtml>
113. [http://www.ensembl.org/Xenopus\\_tropicalis/Info/Index](http://www.ensembl.org/Xenopus_tropicalis/Info/Index)
114. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

115. <http://www.nimr.mrc.ac.uk/devbiol/zimmerman/xenopus/>